

534392



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

REC'D 23 DEC 2003

WIPO

PCT

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterla-
gen stimmen mit der
ursprünglich eingereichten
Fassung der auf dem näch-
sten Blatt bezeichneten
europäischen Patentanmel-
dung überein.

The attached documents
are exact copies of the
European patent application
described on the following
page, as originally filed.

Les documents fixés à
cette attestation sont
conformes à la version
initialement déposée de
la demande de brevet
européen spécifiée à la
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

03090151.6

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R C van Dijk

BEST AVAILABLE COPY



Anmeldung Nr:
Application no.: 03090151.6
Demande no:

Anmeldetag:
Date of filing: 21.05.03
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Bayer CropScience GmbH
Brüningstrasse 50
65926 Frankfurt
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.
If no title is shown please refer to the description.
Si aucun titre n'est indiqué se référer à la description.)

Verfahren zur Verringerung des Acrylamidgehaltes von wärmebehandelten
Lebensmitteln

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)
revendiquée(s)

Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/
Classification internationale des brevets:

A23L/

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten/Contracting states designated at date of
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL
PT RO SE SI SK TR LI

Verfahren zur Verringerung des Acrylamidgehaltes von wärmebehandelten Lebensmitteln

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verringerung des Acrylamidgehaltes von wärmebehandelten Lebensmitteln im Vergleich zu herkömmlichen wärmebehandelten Lebensmitteln.

10 Kürzlich wurden von der schwedischen Lebensmittelbehörde (Swedish National Food Administration, NFA) und von Wissenschaftlern der Universität Stockholm neue Forschungsergebnisse veröffentlicht, wonach in verschiedenen Lebensmitteln, die beim Zubereiten hoch erhitzt werden, Acrylamid, eine giftige und möglicherweise krebserregende Substanz, gebildet wird. Die NFA informierte andere nationale und
15 internationale Behörden und Organisationen, um eine internationale Zusammenarbeit und Forschung anzuregen, da es sich bei der Acrylamid-Bildung beim Erhitzen von Lebensmitteln wahrscheinlich um ein weit verbreitetes Phänomen handelt. Daraufhin fand im Sommer 2002 in Genf eine gemeinsam von der Welt-Ernährungsorganisation (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) und der Welt-
20 Gesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) einberufene Expertenberatung zur gesundheitlichen Bedeutung des Vorkommens von Acrylamid in Lebensmitteln statt (WHO, FAO/WHO Consultation on the Health Implications of Acrylamide in Food (Geneva, 25-27 June 2002)).

25 Die Expertenberatung diskutierte als wesentliche Endpunkte der toxikologischen Wirkungen von Acrylamid Neurotoxizität, Reproduktionstoxizität, Mutagenität und Kanzerogenität.

Insbesondere ging die Expertenberatung davon aus, dass das genotoxische Potential
30 von Acrylamid und seinem Stoffwechselprodukt Glycidamid eine wichtige Rolle spielt. Acrylamid ist in vivo genotoxisch in Körperzellen und in Keimzellen. Es kann daher vererbare Schäden auf der Ebene der Gene wie der Chromosomen bewirken. Bekanntermaßen ist eines seiner Stoffwechselprodukte das Glycidamid, ein chemisch reaktionsfähiges Epoxid, das direkt mit der DNA reagieren und Addukte bilden kann. Es

wurde hervorgehoben, dass genotoxische Mechanismen die wesentliche Rolle bei der Kanzerogenität von Acrylamid spielen.

Die Expertenberatung bewertete die vorliegenden Daten aus Studien mit Labortieren. Sie hob dabei besonders die Bedeutung genotoxischer Mechanismen der Kanzerogenese hervor und war der Auffassung, dass zusätzliche alternative Mechanismen, z.B. hormonaler Natur, bisher kaum belegt seien.

Die internationale Expertenkonsultation beschreibt die kanzerogene Potenz von Acrylamid in Ratten als vergleichbar zu der anderer in bestimmten Lebensmitteln z.T. in Abhängigkeit von der Zubereitung vorkommenden Kanzerogenen, z.B. Benzpyren. Acrylamid komme allerdings in höheren Gehalten vor als alle bisher in Lebensmitteln gefundenen Kanzerogene. Für Menschen ist die relative Potenz von krebserregenden Stoffen in Lebensmitteln nicht bekannt. Die Daten aus epidemiologischen Studien bei beruflich exponierten Arbeitern sind wenig bedeutsam, da sie alle nicht geeignet sind, kleine Veränderungen im Krebsrisiko zu erfassen. Insgesamt beurteilte die Expertenkonsultation die Gegenwart von Acrylamid in Lebensmitteln als besorgniserregend.

Auf der verfügbaren Datenbasis kam die Expertenkonsultation der WHO/FAO zu dem Ergebnis, dass Lebensmittel einen bedeutenden Beitrag zur Verbraucherexposition leisten.

Acrylamid bildet sich, wenn bestimmte Lebensmittel bei höheren Temperaturen zubereitet werden. Neben der hohen Temperatur spielt die Zeitdauer der Einwirkung hoher Temperaturen eine Rolle. Die internationale Expertenanhörung konnte keine weiteren gesicherten Hinweise auf den Bildungsmechanismus erkennen. Die Bildungsmechanismen von Acrylamid werden laut der Expertenberatung nach wie vor nicht verstanden.

Unter bestimmten Versuchsbedingungen scheint sich Acrylamid in vitro zu bilden bei der Reaktion von Aminosäuren, insbesondere von Asparagin (Mottram et al., Nature 419, (2002), 448; Stadler et al., Nature 419, (2002), 449) mit Zuckern, wie z.B. Fruktose, Galaktose, Laktose oder Saccharose (Stadler et al., Nature 419, (2002), 449).

Die Ursachen der Variabilität der Acrylamidgehalte in wärmebehandelten Lebensmitteln sind bisher jedoch nicht ausreichend verstanden (WHO, FAO/WHO Consultation on the Health Implications of Acrylamide in Food (Genf, 25.-27. Juni 2002)).

- 5 Die von der FAO und der WHO einberufene internationale Expertenkonsultation empfahl die Erforschung der Beziehung zwischen Verarbeitungsbedingungen der Lebensmittel und der Bildung von Acrylamid sowie die Optimierung der Verarbeitungsbedingungen mit dem Ziel der Minimierung der Acrylamidgehalte.
- 10 Verfahren zur Minimierung der Acrylamidgehalte in wärmebehandelten Lebensmitteln sind im Stand der Technik bisher nicht beschrieben und werden dringend benötigt.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, Verfahren zur Verfügung zu stellen, die die Herstellung von wärmebehandelten Lebensmitteln erlauben, die im
 15 Vergleich zu herkömmlichen wärmebehandelten Lebensmitteln einen verringerten Gehalt an Acrylamid aufweisen.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

20 Die vorliegende Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Verringerung des Acrylamidgehaltes von wärmebehandelten Lebensmitteln im Vergleich zu entsprechenden herkömmlichen wärmebehandelten Lebensmitteln umfassend

- a) die Bereitstellung oder Auswahl von pflanzlichem Material, das im
 25 Vergleich zu entsprechendem herkömmlichen pflanzlichen Material einen verringerten Gehalt an löslichen Zuckern und/oder Aminosäuren aufweist;
- b) die Verarbeitung besagten pflanzlichen Materials zu einem Lebensmittel; und
- 30 c) die Wärmebehandlung des in Verfahrensschritt b) erzeugten Lebensmittels.

Acrylamid (CAS-Nummer 79-06-1), das auch als 2-Propenamid, Vinylamid oder Ethylencarboxamid bezeichnet wird, ist ein bei Raumtemperatur farbloser Feststoff, der
 35 sehr gut in Wasser löslich, jedoch unlöslich in Heptan ist.

Unter dem Begriff „Verringerung des Acrylamidgehaltes“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung die Verringerung des Gehaltes an Acrylamid um mindestens 15%, insbesondere um mindestens 30%, vorzugsweise um mindestens 50%, 75% und besonders bevorzugt um mindestens 90% im Vergleich zum Acrylamidgehalt von entsprechenden herkömmlichen wärmebehandelten Lebensmitteln verstanden werden.

Verfahren zur Bestimmung des Acrylamidgehaltes von Lebensmitteln wurden beispielweise beschrieben in Tareke et al. (J. Agric. Food Chem. 50, (2002), 4998-5006). Die quantitative Bestimmung des Acrylamids erfolgte hierbei mittels GC/MS nach Derivatisierung oder mittels LC/MS-MS. Die Derivatisierung zum Di-Brom-Produkt kann beispielsweise gemäß EPA-Methode 8032A (<http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/8032a.pdf>, Fassung Dezember 1996, „Acrylamide by gas chromatography“) der U.S. Environmental Protection Agency (= EPA) erfolgen.

Unter dem Begriff „Lebensmittel“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung jedes Lebensmittel verstanden werden, das pflanzliches Material enthält. Der Begriff umfasst insbesondere Vorstufen, wie z.B. Teigmischungen, Kartoffelscheiben, Granulate und Maiskörner, die zur Erzeugung „wärmebehandelter Lebensmittel“ geeignet sind. Die Vorstufen, insbesondere Kartoffelscheiben, zur Erzeugung der wärmebehandelten Lebensmittel können hierbei auch in vorgekochter oder blanchierter Form vorliegen.

Unter dem Begriff „wärmebehandeltes Lebensmittel“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung jedes Lebensmittel verstanden werden, das Temperaturen von > 100 °C, vorzugsweise von 110°C bis 230°C, insbesondere von 120°C – 200°C, vorzugsweise von 150°C – 170°C ausgesetzt wurde. Unter dem Begriff der „Wärmebehandlung“ versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung jede Behandlung, die unter Normaldruckbedingungen zu Temperaturen von mehr als 100°C führt, insbesondere versteht man hierunter das Frittieren, Grillen, Braten, Rösten, Extrudieren, Backen oder die Mikrowellenerhitzung.

Die Dauer der Wärmebehandlung kann je nach Lebensmittel unterschiedlich sein. Grundsätzlich steigen die absoluten Acrylamidgehalte mit der Dauer der Wärmebehandlung an. Mit Hilfe der vorliegenden Erfindung ist es jetzt möglich, den

Acrylamidgehalt eines bei einer bestimmten Temperatur für eine bestimmte Dauer nach einer bestimmten Methode wärmebehandelten Lebensmittels im Vergleich zu herkömmlichen wärmebehandelten Lebensmitteln zu senken.

- 5 Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, insbesondere im Hinblick auf Pommes Frites und Chips, erfolgt die Wärmebehandlung, wenn es sich hierbei um einen Frittiervorgang handelt, für 10 Sekunden bis 8 Minuten, vorzugsweise für zwei bis fünf Minuten, besonders bevorzugt für zwei bis drei Minuten. Handelt es sich bei der Wärmebehandlung um einen Backvorgang, so erfolgt die Wärmebehandlung im
10 Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung für eine bis 120 Minuten, vorzugsweise für 5 bis 30 Minuten.

- Beispiele für solche „wärmebehandelten Lebensmittel“ sind Kartoffelchips, Pommes Frites, Kartoffelpuffer, Kekse, Kracker, Knäckebrot, Frühstückscerealien, Maischips
15 (Tacos), Pop Corn, Brotchips, Waffeln, Salzstangen, Kaffee, Brot, Brötchen, Kuchen, Reischips, Pizza und Toastbrot, ferner Tortillas, Kroketten, Wedges, Kartoffelsticks, Twister, Panaden für Fleisch, Fisch und Gemüse, Panaden für Nüsse.

- Unter dem Begriff „herkömmliches wärmebehandeltes Lebensmittel“ soll im
20 Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Lebensmittel verstanden werden, das aus herkömmlichem pflanzlichen Material erzeugt wurde. Der Begriff „entsprechendes herkömmliches wärmebehandeltes Lebensmittel“ bezieht sich im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung vorzugsweise auf ein solches wärmebehandeltes Lebensmittel, das aus herkömmlichem pflanzlichen Material
25 hergestellt wurde, das auf gleichem Wege verarbeitet und wärmebehandelt wurde wie das erfindungsgemäß einzusetzende pflanzliche Material, das im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichen pflanzlichen Material aber aufgrund einer genetischen Modifikation einen verringerten Gehalt an löslichen Zuckern und/oder Aminosäuren aufweist.

- 30 Unter dem Begriff „pflanzliches Material“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung jedes Material verstanden werden, das aus Pflanzen besteht oder das Teile von Pflanzen umfasst. Vorzugsweise handelt es sich bei besagten Teilen von Pflanzen um Ernteprodukte von Pflanzen, wie z.B. Knollen, Früchte, Samen, Zwiebeln und
35 Wurzeln. Das pflanzliche Material kann aus jeder beliebigen Pflanzenspezies stammen,

d.h. sowohl aus monokotyledonen als auch aus dikotyledonen Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um pflanzliches Material aus landwirtschaftlichen Nutzpflanzen, d.h. aus Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke. Besonders bevorzugt ist pflanzliches Material aus stärke-speichernden Pflanzen (z.B. Weizen, Gerste, Hafer, Roggen, Kartoffel, Mais, Reis, Erbse, Maniok), insbesondere aus Kartoffelpflanzen.

Unter dem Begriff „herkömmliches pflanzliches Material“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung insbesondere pflanzliches Material von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzen verstanden werden, d.h. von Pflanzen, die keine genetische Modifikation aufweisen, welche zu einer Verringerung des Gehaltes an löslichen Zuckern, insbesondere an Glukose und/oder Fruktose, und/oder zu einer Verringerung des Gehaltes an Aminosäuren, insbesondere Asparagin, führt im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen. Herkömmliches pflanzliches Material im Sinne der vorliegenden Erfindung kann jedoch auch von genetisch modifizierten Pflanzen stammen, die in anderer Hinsicht genetisch modifiziert sind, wo die genetische Modifikation jedoch nicht zu einer Verringerung des Gehaltes an löslichen Zuckern, insbesondere an Glukose und/oder Fruktose, und/oder zu einer Verringerung des Gehaltes an Aminosäuren, insbesondere Asparagin, führt im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen.

Der Begriff „genetische Modifikation“ wird weiter unten definiert.

Unter dem Begriff „löslicher Zucker“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung jeder in pflanzlichem Material vorkommende, wasserlösliche Zucker verstanden werden, vorzugsweise handelt es sich bei den löslichen Zuckern um Hexosen, vorzugsweise um reduzierende Zucker, insbesondere um Fruktose und/oder Glukose.

Unter dem Begriff „Verringerung des Gehaltes an löslichen Zuckern“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung die Verringerung des Gehaltes an löslichen Zuckern, insbesondere an Fruktose und/oder Glukose, um mindestens 10%, insbesondere um mindestens 15%, vorzugsweise um mindestens 20% und besonders bevorzugt um mindestens 40% im Vergleich zum Gehalt an löslichen Zuckern,

insbesondere an Fruktose und/oder Glukose von entsprechenden herkömmlichen wärmebehandelten Lebensmitteln verstanden werden.

5 Unter dem Begriff „Aminosäure“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung jede in pflanzlichem Material vorkommende Aminosäure verstanden werden, vorzugsweise handelt es sich hierbei um Asparagin.

10 Unter dem Begriff „Verringerung des Gehaltes an Aminosäuren“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung die Verringerung des Gehaltes an Aminosäuren, insbesondere an Asparagin, um mindestens 10%, insbesondere um mindestens 15%, vorzugsweise um mindestens 20% und besonders bevorzugt um mindestens 40% im Vergleich zum Gehalt an Aminosäuren, insbesondere an Asparagin, von entsprechenden herkömmlichen wärmebehandelten Lebensmitteln verstanden werden.

15 Die Ursachen der Variabilität der Acrylamidgehalte in wärmebehandelten Lebensmitteln sind bisher nicht ausreichend verstanden (WHO, FAO/WHO Consultation on the Health Implications of Acrylamide in Food (Geneva, 25-27 June 2002), so dass bisher keine Verfahren zur Minimierung der Acrylamidgehalte in wärmebehandelten Lebensmitteln beschrieben wurden. Insbesondere wurden keine Verfahren beschrieben, die auf der
20 Auswahl bestimmten pflanzlichen Materials basieren.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, dass die Wahl des pflanzlichen Ausgangsmaterials, das zur Herstellung von wärmebehandelten Lebensmitteln eingesetzt wird, einen entscheidenden Einfluss auf die Acrylamidgehalte solcher
25 Lebensmittel hat. Die Erfindung lehrt erstmals, dass der Einsatz von pflanzlichem Material, das im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichen pflanzlichen Material einen verringerten Gehalt an löslichen Zuckern und/oder Aminosäuren aufweist, die Herstellung von Lebensmitteln erlaubt, die nach Wärmebehandlung einen verringerten Gehalt an Acrylamid aufweisen als bei Verwendung pflanzlichen Materials mit
30 herkömmlichen Gehalten an löslichen Zuckern und/oder Aminosäuren. Die vorliegende Erfindung lehrt daher zur Vermeidung der Bildung von Acrylamid in wärmebehandelten Lebensmitteln solches pflanzliches Material zu verwenden, das einen vergleichsweise geringen Gehalt an löslichen Zuckern und/oder Aminosäuren aufweist.

Verfahren zur Bestimmung des Gehaltes an Zuckern, insbesondere von Fruktose und Glukose, von pflanzlichem Material sind dem Fachmann bekannt, beispielsweise beschrieben in Müller-Röber et al. (Mol. Gen. Genet. 224, (1990), 136-146) wie auch weiter unten.

5

Verfahren zur Bestimmung des Gehaltes an Aminosäuren, insbesondere Asparagin, von pflanzlichem Material sind dem Fachmann bekannt und beispielsweise beschrieben in Cohen, Meys, Tarvin (1988), The pico-tag method: A Manual of advanced techniques for amino acid analysis, Millipore Corporation, Milford, Mass., USA).

10

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das verwendete pflanzliche Material dadurch gekennzeichnet, dass es genetisch modifiziert ist, wobei die genetische Modifikation zu einer Verringerung des Gehaltes an löslichen Zuckern, insbesondere an Glukose und/oder Fruktose führt im Vergleich zu

15

entsprechendem herkömmlichen pflanzlichen Material von Wildtyp-Pflanzen.

Die „genetische Modifikation“ kann dabei im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung jede genetische Modifikation sein, die zu einer Verringerung des Gehaltes an löslichen Zuckern führt im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichen pflanzlichen

20

Material von Wildtyp-Pflanzen.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung kann die genetische Modifikation durch Mutagenese eines oder mehrerer Gene hervorgerufen werden. Die Art der Mutation ist dafür unerheblich, solange sie zu einer Verringerung des Gehaltes an

25

löslichen Zuckern im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichen pflanzlichen Material von Wildtyp-Pflanzen führt.

Unter dem Begriff „Mutagenese“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung jegliche Art von Mutation verstanden werden, wie z.B. Deletionen, Punktmutationen

30

(Nukleotidaustausche), Insertionen, Inversionen, Genkonversionen oder Chromosomentranslokationen.

Die Mutation kann dabei durch den Einsatz chemischer Agenzien oder energiereicher Strahlung (z.B. Röntgen-, Neutronen-, Gamma- UV-Strahlung) erzeugt werden.

Agenzien, die zur Erzeugung chemisch induzierter Mutationen eingesetzt werden können und die durch Einwirkung der entsprechenden Mutagene dabei entstehenden Mutationen sind z.B. beschrieben bei Ehrenberg und Husain, 1981, (Mutation Research 86, 1-113), Müller, 1972 (Biologisches Zentralblatt 91 (1), 31-48). Die Erzeugung von Reismutanten unter Verwendung von Gamma-Strahlen, Ethyl-Methan-Sulfonat (EMS), N-methyl-N-Nitroharnstoff oder Natriumazid (NaN_3) ist z.B. beschrieben in Jauhar und Siddiq (1999, Indian Journal of Genetics, 59 (1), 23-28), bei Rao (1977, Cytologica 42, 443-450), Gupta und Sharma (1990, Oryza 27, 217-219) und Satoh und Omura (1981, Japanese Journal of Breeding 31 (3), 316-326). Die Erzeugung von Weizenmutanten unter Verwendung von NaN_3 bzw. Maleic hydrazide (1,2-dihydropyridazine-3,6-dione) ist beispielsweise in Arora et al. (1992, Annals of Biology 8 (1), 65-69) beschrieben. Eine Übersicht zur Erzeugung von Weizenmutanten unter Verwendung von verschiedenen Arten energiereicher Strahlung und chemischer Agenzien ist beispielsweise in Scarascia-Mugnozza et al. (1993, Mutation Breeding Review 10, 1-28) dargestellt. Svec et al. (1998, Cereal Research Communications 26 (4), 391-396) beschreiben die Anwendung von N-ethyl-N-Nitroharnstoff zur Erzeugung von Mutanten in Triticale. Die Verwendung von MMS und Gamma Strahlung zur Erzeugung von Hirsemutanten ist in Shashidhara et al. (1990, Journal of Maharashtra Agricultural Universities 15 (1), 20-23) beschrieben.

Die Herstellung von Mutanten in Pflanzenspezies, die sich hauptsächlich vegetativ vermehren, wurde z.B. für Kartoffeln, die eine veränderte Stärke produzieren (Hovenkamp-Hermelink et al. (1987, Theoretical and Applied Genetics 75, 217-221), und für Minze mit erhöhtem Ölertrag bzw. veränderter Ölqualität (Dwivedi et al., 2000, Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences 22, 460-463) beschrieben.

Alle diese Methoden sind grundsätzlich geeignet, pflanzliches Material zur Verfügung zu stellen, das aufgrund einer genetischen Modifikation einen verringerten Gehalt an löslichen Zuckern aufweist im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichen pflanzlichen Material von Wildtyp-Pflanzen und das daher für die Verwendung in dem erfindungsgemäßen Verfahren geeignet ist.

Das Auffinden von Mutationen in den entsprechenden Genen kann mit Hilfe von dem Fachmann bekannten Methoden geschehen. Insbesondere können hierzu Analysen, basierend auf Hybridisierungen mit Sonden (Southern Blot), der Amplifikation mittels Polymerase Ketten Reaktion (PCR), der Sequenzierung betreffender genomischer

Sequenzen und die Suche nach einzelnen Nukleotidaustauschen angewandt werden. Eine Methode, um Mutationen anhand von Hybridisierungsmustern zu identifizieren, ist z.B. die Suche nach Restriktionsfragment Längenunterschieden (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) (Nam et al., 1989, The Plant Cell 1, 699-705; Leister and Dean, 1993, The Plant Journal 4 (4), 745-750). Eine auf PCR basierende Methode ist z.B. die Analyse von amplifizierten Fragment Längenunterschieden (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) (Castiglioni et al., 1998, Genetics 149, 2039-2056; Meksem et al., 2001, Molecular Genetics and Genomics 265, 207-214; Meyer et al., 1998, Molecular and General Genetics 259, 150-160). Auch die Verwendung von mit Restriktionsendonukleasen geschnittenen amplifizierten Fragmenten (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences, CAPS) kann zur Identifizierung von Mutationen herangezogen werden (Konieczny und Ausubel, 1993, The Plant. Journal 4, 403-410; Jarvis et al., 1994, Plant Molecular Biology 24, 685-687; Bachem et al., 1996, The Plant Journal 9 (5), 745-753). Methoden zur Ermittlung von SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) sind u.a. von Qi et al. (2001, Nucleic Acids Research 29 (22), e116) Drenkard et al. (2000, Plant Physiology 124, 1483-1492) und Cho et al. (1999, Nature Genetics 23, 203-207) beschrieben worden. Insbesondere sind Methoden geeignet, die es erlauben, viele Pflanzen innerhalb kurzer Zeit auf Mutationen in bestimmten Genen hin zu untersuchen. Eine solche Methode, das sogenannte TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes), ist beispielsweise von McCallum et al. (2000, Plant Physiology 123, 439-442) beschrieben worden.

Die Verwendung aller dieser Methoden ist grundsätzlich geeignet, um genetisch modifiziertes pflanzliches Material, das für die Verwendung in dem erfindungsgemäßen Verfahren geeignet ist, zu identifizieren.

Ferner kann das im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung einsetzbare genetisch modifizierte pflanzliche Material mittels gentechnischer Methoden (antisense-, cosuppressions-Technologie, Ribozyme, in-vivo-Mutagenese, RNAi-Technologie etc.) erzeugt werden.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens führt die genetische Modifikation zu einer Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden R1-Proteine im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

Unter dem Begriff „R1-Protein“ versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Protein, die beispielsweise in Lorberth et al. (Nature Biotech. 16, (1998), 473-477), Ritte et al., (PNAS 99, (2002), 7166-7171) sowie in den internationalen Patentanmeldungen WO98/27212, WO00/77229, WO00/28052 beschrieben worden sind und die die folgenden Charakteristika aufweisen. Wichtige Charakteristika von R1 Proteinen sind i) ihre Aminosäuresequenz (s. beispielsweise GenBank Acc. No. A61831, Y09533); ii) ihre Lokalisation in den Plastiden pflanzlicher Zellen; iii) ihre Fähigkeit zur Beeinflussung des Grades der Phosphorylierung der Stärke in Pflanzen.

Beispielsweise führt die Inhibierung des R1-Gens codierend für ein R1-Protein aus Kartoffel in transgenen Kartoffelpflanzen zu einer Verringerung des Phosphatgehaltes der aus den Kartoffelknollen isolierbaren Stärke. Darüber hinaus konnten Lorberth et al. zeigen, dass das R1-Protein aus *Solanum tuberosum* in der Lage ist, bakterielles Glykogen zu phosphorylieren, wenn man die korrespondierende R1 cDNA in *E. coli* exprimiert (Lorberth et al., Nature Biotech. 16, (1998), 473-477).

Ritte et al. (Plant J. 21, (2000), 387-391) konnten zeigen, dass das R1-Protein aus *Solanum tuberosum* in Kartoffelpflanzen reversibel an Stärkekörner bindet, wobei die Stärke der Bindung an das Stärkekorn abhängt vom metabolischen Status der Pflanze. In stärkekorngelagerter Form liegt das Protein in Kartoffelpflanzen vornehmlich bei Blättern vor, die im Dunklen gehalten wurden. Nach Beleuchtung der Blätter liegt das Protein dagegen hauptsächlich in der löslichen, nicht an das Stärkekorn gebundenen Form vor.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ist von besonderer Bedeutung, dass die Inhibierung der Expression des R1-Gens aus Kartoffel in transgenen Kartoffelpflanzen bzw. bei deren Knollen zu einer Verringerung des sogenannten „cold-induced-sweetenings“ (Lorberth et al., Nature Biotech. 16, (1998), 473-477) führt, d.h. kaltgelagerte Kartoffelknollen weisen im Vergleich zu Knollen entsprechender nicht genetisch modifizierter Wildtyp-Pflanzen einen verringerten Gehalt an löslichen Zuckern auf, insbesondere an Fruktose und Glukose.

Ferner weisen die Kartoffelknollen dieser transgenen Pflanzen mit verminderter R1-Genexpression auch bereits unmittelbar nach der Ernte oder nach Lagerung bei Raumtemperatur im Vergleich zu Knollen entsprechender nicht genetisch modifizierter Wildtyp-Pflanzen einen verringerten Gehalt an löslichen Zuckern auf, insbesondere an Fruktose und Glukose.

Durch die vorliegende Erfindung konnte erstmals gezeigt werden, dass die Frittierung von (kaltgelagerten) Kartoffelknollen, die von Pflanzen mit verminderter R1-Genexpression stammen (Lorberth et al., Nature Biotech. 16, (1998), 473-477), zu einer
5 deutlich verringerten Acrylamidbildung in den frittierten Produkten führt als bei Frittierung entsprechender nicht genetisch modifizierter Kartoffelknollen.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens führt die genetische Modifikation zu einer Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer
10 endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden Invertase-Proteine im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

Unter dem Begriff „Invertase-Protein“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Proteine mit der enzymatischen Aktivität einer Invertase verstanden werden.
15 Invertasen katalysieren die Spaltung von Saccharose in Glukose und Fruktose. Vorzugsweise handelt es sich im Rahmen der vorliegenden Erfindung um saure Invertasen, die auch als vakuoläre Invertasen bezeichnet werden und beispielsweise bei Zrenner et al. (Planta 198, (1996), 246-252) beschrieben wurden.

20 Kartoffel-Pflanzen mit verminderter Invertase-Aktivität wurden beispielsweise beschrieben bei Zrenner et al. (Planta 198, (1996), 246-252) und bei Greiner et al. (Nature Biotechnology 17, (1999), 708-711).

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ist von besonderer Bedeutung, dass
25 die Verringerung der Invertase-Aktivität in transgenen Kartoffelpflanzen, insbesondere bei solchen, die einen vakuolären Invertase-Inhibitor aus Tabak exprimieren (Greiner et al., Nature Biotechnology 17, (1999), 708-711), dazu führt, dass kaltgelagerte Kartoffelknollen dieser transgenen Pflanzen einen im Vergleich zu Knollen entsprechender nicht genetisch modifizierter Wildtyp-Pflanzen verringerten Gehalt an
30 löslichen Zuckern aufweisen, insbesondere an Fruktose und Glukose.

Der Begriff "Verringerung der Aktivität" bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Verringerung der Expression endogener Gene, die R1- oder Invertase-Proteine codieren, und/oder eine Verringerung der Menge an R1- oder Invertase-Protein in den

Zellen des pflanzlichen Materials und/oder eine Verringerung der enzymatischen Aktivität der R1- oder Invertase-Proteine in den Zellen des pflanzlichen Materials.

Der Begriff "Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden R1-Proteine" bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Verringerung der Expression eines oder mehrerer endogener Gene, die R1-Proteine codieren, und/oder eine Verringerung der Menge an R1-Protein in den Zellen des pflanzlichen Materials und/oder eine Verringerung der enzymatischen Aktivität der R1-Proteine in den Zellen des pflanzlichen Materials.

Der Begriff "Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden Invertase-Proteine" bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Verringerung der Expression eines oder mehrerer endogener Gene, die Invertase-Proteine codieren, und/oder eine Verringerung der Menge an Invertase-Protein in den Zellen des pflanzlichen Materials und/oder eine Verringerung der enzymatischen Aktivität der Invertase-Proteine in den Zellen des pflanzlichen Materials.

Die Verringerung der Expression kann beispielsweise bestimmt werden durch Messung der Menge an R1- oder Invertase-Protein codierenden Transkripten, z.B. durch Northern-Blot-Analyse oder RT-PCR. Eine Verringerung bedeutet dabei vorzugsweise eine Verringerung der Menge an Transkripten im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 50%, insbesondere um mindestens 70%, bevorzugt um mindestens 85% und besonders bevorzugt um mindestens 95%.

Die Verringerung der Menge an R1- oder Invertase-Proteinen, die eine verringerte Aktivität dieser Proteine in den betreffenden Pflanzenzellen zur Folge hat, kann beispielsweise bestimmt werden durch immunologische Methoden wie Western-Blot-Analyse, ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) oder RIA (Radio Immune Assay). Eine Verringerung bedeutet dabei vorzugsweise eine Verringerung der Menge an R1- oder Invertase-Protein im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 50%, insbesondere um mindestens 70%, bevorzugt um mindestens 85% und besonders bevorzugt um mindestens 95%.

Die Verringerung der enzymatischen Aktivität des R1-Proteins kann in Anlehnung an einen von Ritte et al. (PNAS 99, (2002), 7166-7171) beschriebenen enzymatischen Assay bestimmt werden.

- 5 Die Verringerung der enzymatischen Aktivität des Invertase-Proteins kann nach der von Greiner et al. (Nature Biotechnology 17, (1999), 708) beschriebenen Methode bestimmt werden.

10 Eine Verringerung der enzymatischen Aktivität des R1- oder des Invertase-Proteins bedeutet dabei vorzugsweise eine Verringerung der Aktivität im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 50%, insbesondere um mindestens 60% und bevorzugt um mindestens 70%.

15 In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht die genetische Modifikation in der Einführung eines oder mehrerer fremder Nucleinsäuremoleküle, deren Vorhandensein und/oder Expression zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden R1-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

20 In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht die genetische Modifikation in der Einführung eines oder mehrerer fremder Nucleinsäuremoleküle, deren Vorhandensein und/oder Expression zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden Invertase-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

30 Unter dem Begriff "fremdes Nucleinsäuremolekül" bzw. „fremder Nucleinsäuremoleküle“ versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein solches Molekül, das entweder natürlicherweise in entsprechenden Pflanzenzellen nicht vorkommt, oder das in der konkreten räumlichen Anordnung nicht natürlicherweise in den Pflanzenzellen vorkommt oder das an einem Ort im Genom der Pflanzenzelle lokalisiert ist, an dem es natürlicherweise nicht vorkommt. Bevorzugt ist das fremde Nucleinsäuremolekül, ein rekombinantes Molekül, das aus verschiedenen Elementen

besteht, deren Kombination oder spezifische räumliche Anordnung natürlicherweise in pflanzlichen Zellen nicht auftritt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das fremde Nucleinsäuremolekül ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- (a) DNA-Molekülen, die mindestens eine antisense-RNA codieren, welche eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die R1-Proteine codieren;
- (b) DNA-Molekülen, die über einen Cosuppressionseffekt zu Verringerung der Expression von endogenen Genen führen, die R1-Proteine codieren;
- (c) DNA-Molekülen, die mindestens ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte von endogenen Genen spaltet, die R1-Proteine codieren;
- (d) Mittels in vivo-Mutagenese eingeführter Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in endogenen R1-Proteinen codierenden Genen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven R1-Proteinen bewirkt;
- (e) DNA-Molekülen, die simultan mindestens eine antisense-RNA und mindestens eine sense-RNA codieren, wobei besagte antisense-RNA und besagte sense-RNA ein doppelsträngiges RNA-Molekül ausbilden, das eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die R1-Proteine codieren;
- (f) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, wobei die Integration der Transposonsequenzen zu einer Mutation oder einer Insertion in endogenen R1-Proteinen codierenden Genen führt, welche zu einer Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven R1-Proteinen bewirkt; und
- (g) T-DNA Moleküle, die durch Insertion in endogenen R1-Protein codierenden Genen eine Verringerung der Expression von R1-Protein codierenden Genen oder die Synthese von inaktiven R1-Proteinen bewirkt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das fremde Nucleinsäuremolekül, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- (a) DNA-Molekülen, die einen Invertase-Inhibitor codieren.

- (b) DNA-Molekülen, die mindestens eine antisense-RNA codieren, welche eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die Invertase-Proteine codieren;
- (c) DNA-Molekülen, die über einen Cosuppressionseffekt zu Verringerung der Expression von endogenen Genen führen, die Invertase -Proteine codieren;
- (d) DNA-Molekülen, die mindestens ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte von endogenen Genen spaltet, die Invertase -Proteine codieren;
- (e) Mittels in vivo-Mutagenese eingeführter Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in endogenen Invertase-Proteinen codierenden Genen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven Invertase -Proteinen bewirkt;
- (f) DNA-Molekülen, die simultan mindestens eine antisense-RNA und mindestens eine sense-RNA codieren, wobei besagte antisense-RNA und besagte sense-RNA ein doppelsträngiges RNA-Molekül ausbilden, das eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die Invertase-Proteine codieren;
- (g) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, wobei die Integration der Transposonsequenzen zu einer Mutation oder einer Insertion in endogenen Invertase-Proteinen codierenden Genen führt, welche zu einer Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven Invertase -Proteinen bewirkt; und
- (h) T-DNA Moleküle, die durch Insertion in endogenen Invertase-Protein codierenden Genen eine Verringerung der Expression von Invertase-Protein codierenden Genen oder die Synthese von inaktiven Invertase-Proteinen bewirkt.

Zur Inhibierung der Genexpression mittels antisense- oder cosuppressions-Technologie kann beispielsweise ein DNA-Molekül verwendet werden, das die gesamte für ein R1- oder Invertase-Protein codierende Sequenz einschließlich eventuell vorhandener flankierender Sequenzen umfasst, als auch DNA-Moleküle, die nur Teile der codierenden Sequenz umfassen, wobei diese Teile lang genug sein müssen, um in den Zellen einen antisense-Effekt bzw. cosuppressions-Effekt zu bewirken. Geeignet sind im allgemeinen Sequenzen bis zu einer Mindestlänge von 15 bp, vorzugsweise einer Länge von 100-500 bp, für eine effiziente antisense- bzw. cosuppressions-Inhibition sind besonders bevorzugt Sequenzen mit einer Länge über 500 bp. Diese Aussagen gelten für die Inhibierung der BE I-Genexpression entsprechend.

Für antisense- oder cosuppressions-Ansätze geeignet ist auch die Verwendung von DNA-Sequenzen, die einen hohen Grad an Homologie zu den endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden Sequenzen haben, die ein R1- oder Invertase-Protein codieren. Die minimale Homologie sollte größer als ca. 65 % sein. Die Verwendung von Sequenzen mit Homologien von mindestens 90%, insbesondere zwischen 95 und 100% ist zu bevorzugen. Diese Aussagen gelten für die Inhibierung der BE I-Genexpression entsprechend.

Ferner ist zur Erzielung eines antisense- oder eines cosuppressions-Effektes auch die Verwendung von Introns, d.h. von nicht-codierenden Bereichen von Genen, die für ein R1- oder Invertase-Protein kodieren, denkbar.

Die Verwendung von Intron-Sequenzen zur Inhibierung der Genexpression von Genen, die für Proteine der Stärkebiosynthese codieren, wurde beispielsweise beschrieben in den internationalen Patentanmeldungen WO97/04112, WO97/04113, WO98/37213, WO98/37214. Diese Aussagen gelten für die Inhibierung der BE I-Genexpression entsprechend.

Dem Fachmann ist bekannt, wie er einen antisense- und einen cosuppressions- Effekt erzielen kann. Das Verfahren der cosuppressions-Inhibierung wurde beispielsweise beschrieben in Jorgensen (Trends Biotechnol. 8 (1990), 340-344), Niebel et al., (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 91-103), Flavell et al. (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 43-46), Palauqui und Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149-159), Vaucheret et al., (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311-317), de Borne et al. (Mol. Gen. Genet. 243 (1994), 613-621).

Auch die Expression von Ribozymen zur Verringerung der Aktivität von bestimmten Enzymen in Zellen ist dem Fachmann bekannt und ist beispielsweise beschrieben in EP-B1 0321201. Die Expression von Ribozymen in pflanzlichen Zellen wurde z.B. beschrieben in Feyter et al. (Mol. Gen. Genet. 250, (1996), 329-338).

Ferner kann die Verringerung der R1- oder Invertase-Aktivität in den Pflanzenzellen des pflanzlichen Materials auch durch die sogenannte "in vivo-Mutagenese" erreicht werden, bei der durch Transformation von Zellen ein hybrides RNA-DNA-Oligonucleotid ("Chimeroplast") in Zellen eingeführt wird (Kipp, P.B. et al., Poster Session beim " 5th International Congress of Plant Molecular Biology, 21.-27. September 1997, Singapore;

R. A. Dixon und C.J. Amtzen, Meeting report zu "Metabolic Engineering in Transgenic Plants", Keystone Symposia, Copper Mountain, CO, USA, TIBTECH 15, (1997), 441-447; internationale Patentanmeldung WO 9515972; Kren et al., Hepatology 25, (1997), 1462-1468; Cole-Strauss et al., Science 273, (1996), 1386-1389; Beetham et al., (1999), PNAS 96, 8774-8778).

Ein Teil der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids ist homolog zu einer Nucleinsäuresequenz eines endogenen R1- oder Invertase-Gens, weist jedoch im Vergleich hierzu eine Mutation auf oder enthält eine heterologe Region, die von den homologen Regionen umschlossen ist.

Durch Basenpaarung der homologen Regionen des RNA-DNA-Oligonucleotids und des endogenen Nucleinsäuremoleküls, gefolgt von homologer Rekombination, kann die in der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids enthaltene Mutation oder heterologe Region in das Genom einer Pflanzenzelle übertragen werden. Dies führt zu einer Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer R1- oder Invertase-Proteine. Diese Aussagen gelten für die Inhibierung der BE I - Genexpression entsprechend.

Ferner kann die Verringerung der R1- oder Invertase-Aktivität in den Pflanzenzellen auch durch die simultane Expression von sense und antisense RNA Molekülen des jeweiligen zu reprimierenden Zielgens, vorzugsweise des R1- oder Invertase-Gens, hervorgerufen werden.

Dies kann beispielsweise durch die Verwendung von chimären Konstrukten erreicht werden, die „inverted repeats“ des jeweiligen Zielgens oder Teile des Zielgens enthalten. Hierbei codieren die chimären Konstrukte für sense und antisense RNA Moleküle des jeweiligen Zielgens. Sense und antisense RNA werden *in planta* gleichzeitig als ein RNA-Molekül synthetisiert, wobei sense und antisense RNA durch einen Spacer voneinander getrennt sein und ein doppelsträngiges RNA-Molekül bilden können.

Es konnte gezeigt werden, dass die Einführung von inverted-repeat-DNA-Konstrukten in das Genom von Pflanzen eine sehr effiziente Methode ist, um die zu den inverted-repeat-DNA-Konstrukten korrespondierenden Gene zu reprimieren (Waterhouse et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, (1998), 13959-13964; Wang and Waterhouse, Plant Mol. Biol. 43, (2000), 67-82; Singh et al., Biochemical Society Transactions Vol. 28 part 6 (2000), 925- 927; Liu et al., Biochemical Society Transactions Vol. 28 part 6 (2000), 927-929); Smith et al., (Nature 407, (2000), 319-320; internationale Patentanmeldung WO99/53050 A1). Sense und antisense Sequenzen des Zielgens bzw. der Zielgene

können auch getrennt voneinander mittels gleicher oder unterschiedlicher Promotoren exprimiert werden (Nap, J-P et al, 6th International Congress of Plant Molecular Biology, Quebec, 18.-24. Juni, 2000; Poster S7-27, Vortrag Session S7). Diese Aussagen gelten für die Inhibierung der BE I - Genexpression entsprechend.

5

Die Verringerung der R1- oder Invertase-Aktivität in den Pflanzenzellen des pflanzlichen Materials kann somit auch durch die Erzeugung doppelsträngiger RNA-Moleküle von R1- oder Invertase-Genen erreicht werden. Vorzugsweise werden hierzu „inverted repeats“ von DNA-Molekülen von R1- oder Invertase-Genen oder -cDNAs in das

10 Genom von Pflanzen eingeführt, wobei die zu transkribierenden DNA-Moleküle (R1- oder Invertase-Gene oder- cDNAs oder Fragmente dieser Gene oder cDNAs) unter Kontrolle eines Promotors stehen, der die Expression besagter DNA-Moleküle steuert. Diese Aussagen gelten für die Inhibierung der BE I - Genexpression entsprechend.

15 Darüber hinaus ist bekannt, dass die Bildung von doppelsträngigen RNA-Molekülen von Promotor-DNA-Molekülen in Pflanzen *in trans* zu einer Methylierung und einer transkriptionellen Inaktivierung homologer Kopien dieser Promotoren führen kann, die im folgenden als Zielpromotoren bezeichnet werden sollen (Mette et al., EMBO J. 19, (2000), 5194-5201).

20 Über die Inaktivierung des Zielpromotors ist es somit möglich, die Genexpression eines bestimmten Zielgens (z.B. R1- oder Invertase-Gen), das natürlicherweise unter der Kontrolle dieses Zielpromotors steht, zu verringern.

D.h., die DNA-Moleküle, die die Zielpromotoren der zu reprimierenden Gene (Zielgene) umfassen, werden in diesem Fall, im Gegensatz zur ursprünglichen Funktion von

25 Promotoren in Pflanzen, nicht als Steuerelemente zur Expression von Genen oder cDNAs, sondern selbst als transkribierbare DNA-Moleküle verwendet.

Zur Erzeugung der doppelsträngigen Zielpromotor-RNA-Moleküle *in planta*, die dort als RNA-Haarnadel-Moleküle (RNA hairpin) vorliegen können, werden vorzugsweise Konstrukte verwendet, die „inverted repeats“ der Zielpromotor-DNA-Moleküle enthalten,

30 wobei die Zielpromotor-DNA-Moleküle unter Kontrolle eines Promotors stehen, der die Genexpression besagter Zielpromotor-DNA-Moleküle steuert. Anschließend werden diese Konstrukte in das Genom von Pflanzen eingeführt. Die Expression der „inverted repeats“ besagter Zielpromotor-DNA-Moleküle führt *in planta* zur Bildung doppelsträngiger Zielpromotor-RNA-Moleküle (Mette et al., EMBO J. 19, (2000), 5194-

35 5201). Hierdurch kann der Zielpromotor inaktiviert werden.

Die Verringerung der R1- oder Invertase -Aktivität in den Pflanzenzellen kann somit auch durch die Erzeugung doppelsträngiger RNA-Moleküle von Promotorsequenzen von R1- oder Invertase-Genen erreicht werden. Vorzugsweise werden hierzu „inverted repeats“ von Promotor-DNA-Molekülen von R1- oder Invertase-Promotoren in das Genom von Pflanzen eingeführt, wobei die zu transkribierenden Zielpromotor-DNA-Moleküle (R1- oder Invertase -Promotor) unter Kontrolle eines Promotors stehen, der die Expression besagter Zielpromotor-DNA-Moleküle steuert. Diese Aussagen gelten für die Inhibierung der BE I - Genexpression entsprechend.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei dem fremden Nucleinsäuremolekül um inserierte Transposons oder sogenannter transfer DNA (T-DNA) in ein Gen kodierend für ein R1- oder Invertase-Protein, wobei dadurch die Aktivität der besagten Proteine in der betreffenden Zelle des pflanzlichen Materials reduziert wird. Diese Aussagen gelten für die Inhibierung der BE I - Genexpression entsprechend.

Grundsätzlich kann das für das erfindungsgemäße Verfahren geeignete pflanzliche Material sowohl mit Hilfe homologer, als auch heterologer Transposons hergestellt werden, wobei unter Verwendung von homologen Transposons auch solche zu verstehen sind, die bereits natürlicherweise im Pflanzengenom vorhanden sind. Diese Aussagen gelten für die Inhibierung der BE I - Genexpression entsprechend.

Die Veränderung der Expression von Genen mittels Transposons ist dem Fachmann bekannt. Eine Übersicht über die Nutzung von endogenen und heterologen Transposons als Werkzeuge in der Pflanzenbiotechnologie ist in Ramachandran und Sundaresan (2001, Plant Physiology and Biochemistry 39, 234-252) dargestellt. Die Möglichkeit, Mutanten zu identifizieren, bei welchen spezifische Gene durch Transposoninsertionsmutagenese inaktiviert wurden, ist in einer Übersicht von Maes et al. (1999, Trends in Plant Science 4 (3), 90-96) dargestellt. Die Erzeugung von Reismutanten mit Hilfe endogener Transposons ist von Hirochika (2001, Current Opinion in Plant Biology 4, 118-122) beschrieben. Die Identifizierung von Maisgenen, mit Hilfe endogener Retrotransposons wird z.B. von Hanley et al. (2000, The Plant Journal 22 (4), 557-566) dargestellt. Die Möglichkeit, Mutanten mit Hilfe von Retrotransposons herzustellen, und Methoden, Mutanten zu identifizieren, sind von Kumar und Hirochika (2001, Trends in Plant Science 6 (3), 127-134) beschrieben. Die

Aktivität von heterologen Transposons in unterschiedlichen Spezies, ist sowohl für dikotyledone als auch für monokotyledone Pflanzen beschrieben worden: z.B. für Reis (Greco et al., 2001, Plant Physiology 125, 1175-1177; Liu et al., 1999, Molecular and General Genetics 262, 413-420; Hiroyuki et al., 1999, The Plant Journal 19 (5), 605-613; Jeon und Gynheung, 2001, Plant Science 161, 211-219), Gerste (2000, Koprek et al., The Plant Journal 24 (2), 253-263) *Arabidopsis thaliana* (Aarts et al., 1993, Nature 363, 715-717, Schmidt und Willmitzer, 1989, Molecular and General Genetics 220, 17-24; Altmann et al., 1992, Theoretical and Applied Genetics 84, 371-383; Tissier et al., 1999, The Plant Cell 11, 1841-1852), Tomate (Belzile und Yoder, 1992, The Plant Journal 2 (2), 173-179) und Kartoffel (Frey et al., 1989, Molecular and General Genetics 217, 172-177; Knapp et al., 1988, Molecular and General Genetics 213, 285-290).

Die T-DNA Insertionsmutagenese beruht darauf, dass bestimmte Abschnitte (T-DNA) von Ti-Plasmiden aus *Agrobacterium* in das Genom von pflanzlichen Zellen integrieren können. Der Ort der Integration in das pflanzliche Chromosom ist dabei nicht festgelegt, sondern kann an jeder beliebigen Stelle erfolgen. Integriert die T-DNA in einen Abschnitt des Chromosoms, der eine Genfunktion darstellt, so kann dieses zur Veränderung der Genexpression und damit auch zur Änderung der Aktivität eines durch das betreffende Gen kodierte Protein führen. Insbesondere führt die Integration einer T-DNA in den kodierenden Bereich eines Proteins häufig dazu, dass das entsprechende Protein von der betreffenden Zelle gar nicht mehr oder nicht mehr in aktiver Form synthetisiert werden kann. Die Verwendung von T-DNA Insertionen zur Erzeugung von Mutanten ist z.B. für *Arabidopsis thaliana* (Krysan et al., 1999, The Plant Cell 11, 2283-2290; Atipiroz-Leehan und Feldmann, 1997, Trends in genetics 13 (4), 152-156; Parinov und Sundaresan, 2000, Current Opinion in Biotechnology 11, 157-161) und Reis (Jeon und An, 2001, Plant Science 161, 211-219; Jeon et al., 2000, The Plant Journal 22 (6), 561-570) beschrieben. Methoden zur Identifizierung von Mutanten, die mit Hilfe der T-DNA Insertionsmutagenese erzeugt wurden, sind u.a. beschrieben von Young et al., (2001, Plant Physiology 125, 513-518), Parinov et al. (1999, The Plant cell 11, 2263-2270), Thorneycroft et al. (2001, Journal of Experimental Botany 52, 1593-1601), und McKinney et al. (1995, The Plant Journal 8 (4), 613-622).

Die T-DNA Mutagenese ist grundsätzlich zur Erzeugung des pflanzlichen Materials geeignet, das in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden kann.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens führt die genetische Modifikation nicht nur zu einer Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden R1-Proteine, sondern gleichzeitig auch zu einer Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden Verzweigungsenzyms der Isoform I (Branching enzyme I = BEI-Protein), im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

Unter dem Begriff „BEI-Protein“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Verzweigungsenzym (branching enzyme = BE) der Isoform I verstanden werden. Vorzugsweise stammt das BEI-Protein aus Kartoffelpflanzen.

Die Bezeichnung der Isoformen lehnt dabei an der von Smith-White und Preiss vorgeschlagenen Nomenklatur an (Smith-White und Preiss, Plant Mol Biol. Rep. 12, (1994), 67-71, Larsson et al., Plant Mol Biol. 37, (1998), 505-511). Diese Nomenklatur geht davon aus, dass alle Enzyme, die zum BEI-Protein aus Mais (GenBank Acc. No. D11081; Baba et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 181 (1), (1991), 87-94; Kim et al. Gene 216, (1998), 233-243) eine höhere Homologie (Identität) auf Aminosäureebene aufweisen als zum BEII-Protein aus Mais (Genbank Acc. No AF072725 , U65948), als Branching Enzyme der Isoform I oder kurz als BEI-Proteine bezeichnet werden.

„BEI-Protein“ codierende Nukleinsäuremoleküle sind für zahlreiche Pflanzen beschrieben worden, beispielsweise für Mais (Genbank Acc. No. D 11081, AF 072724), Reis (Genbank Acc. No. D11082), Erbse (Genbank Acc. No. X80010) und Kartoffel. Verschiedene Formen des BEI-Gens bzw. des BEI-Proteins aus Kartoffel wurden beispielsweise beschrieben bei Khoshnoodi et al., Eur. J. Biochem. 242 (1), 148-155 (1996), Genbank Acc. No. Y 08786 und bei Kossmann et al., Mol. Gen. Genet. 230, (1991), 39-44). In Kartoffelpflanzen wird das BEI-Gen hauptsächlich in den Knollen und kaum in den Blättern exprimiert (Larsson et al., Plant Mol. Biol. 37, (1998), 505-511).

Hinsichtlich der genetischen Modifikation, die zu einer Verringerung der R1-Aktivität führt, gelten hierbei die oben gemachten Aussagen. Die genetische Modifikation, die zu einer Verringerung der Aktivität des BEI-Proteins I (Branching enzyme I), führt, kann in der Einführung eines oder mehrerer fremder Nukleinsäuremoleküle bestehen, deren Vorhandensein und/oder Expression zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BEI-Proteine der Isoform I führt im

Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das fremde Nucleinsäuremolekül, das zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden BEI-Proteine der Isoform I führt, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- (a) DNA-Molekülen, die mindestens eine antisense-RNA codieren, welche eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die BEI -Proteine codieren;
- (b) DNA-Molekülen, die über einen Cosuppressionseffekt zu Verringerung der Expression von endogenen Genen führen, die BE I-Proteine codieren;
- (c) DNA-Molekülen, die mindestens ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte von endogenen Genen spaltet, die BE I-Proteine codieren;
- (d) Mittels in vivo-Mutagenese eingeführter Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in endogenen BE I-Proteinen codierenden Genen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven BE I-Proteinen bewirkt;
- (e) DNA-Molekülen, die simultan mindestens eine antisense-RNA und mindestens eine sense-RNA codieren, wobei besagte antisense-RNA und besagte sense-RNA ein doppelsträngiges RNA-Molekül ausbilden, das eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die BE I-Proteine codieren;
- (f) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, wobei die Integration der Transposonsequenzen zu einer Mutation oder einer Insertion in endogenen BE I-Proteinen codierenden Genen führt, welche zu einer Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven BE I-Proteinen bewirkt; und
- (g) T-DNA Moleküle, die durch Insertion in endogenen BE I-Protein codierenden Genen eine Verringerung der Expression von BE I-Protein codierenden Genen oder die Synthese von inaktiven BE I-Proteinen bewirkt.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das verwendete pflanzliche Material dadurch gekennzeichnet, dass es genetisch modifiziert ist, wobei die genetische Modifikation zu einer Verringerung des Gehaltes an Aminosäuren, insbesondere an Asparagin führt im Vergleich zu entsprechendem
5 herkömmlichen pflanzlichen Material von Wildtyp-Pflanzen.

Die „genetische Modifikation“ kann dabei im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung jede genetische Modifikation sein, die zu einer Verringerung des Gehaltes an Aminosäuren, insbesondere Asparagin führt im Vergleich zu entsprechendem
10 herkömmlichen pflanzlichen Material von Wildtyp-Pflanzen.

Hinsichtlich der unterschiedlichen denkbaren Wege für die Erzeugung von genetischen Modifikationen, die zu einer Verringerung des Aminosäuregehaltes, insbesondere von Asparagin führen, gelten die allgemeinen oben im Zusammenhang mit den genetischen
15 Modifikationen, die zu einer Verringerung des Gehaltes an Zuckern führen, gemachten Aussagen.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens führt die genetische Modifikation zu einer Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer
20 endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden Asparagin-Synthetase-Proteine im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

Unter einem „Asparagin-Synthetase-Protein“ soll im Zusammenhag mit der vorliegenden Erfindung ein Protein verstanden werden, dass die Umwandlung von Aspartat in Asparagin unter Umwandlung von ATP in AMP und Pyrophosphat sowie von Glutamin in Glutamat katalysiert. Sequenzinformationen für Asparagin-Synthetasen (asn1) wurden beispielsweise beschrieben bei Lam et al. (Plant Physiol. 106(4), (1994),
25 1347-1357).

Pflanzen mit verminderter Asparagin-Synthetase-Aktivität weisen einen im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen verringerten Gehalt an Asparagin auf (Annual Meeting of the American Society of Plant Biologists in Madison, WI, USA, (1998), Molecular and transgenic studies of asparagine synthetase genes in *Arabidopsis*
35 *thaliana* , Abstract Number 535).

Hinsichtlich der Definition des Begriffs "Verringerung der Aktivität" gelten die oben im Zusammenhang mit dem R1- oder dem Invertase-Protein gemachten Aussagen entsprechend. Die Aktivität der Asparagin-Synthetase kann beispielsweise nach der von
 5 Romagni und Dayan (Journal of Agricultural & Food Chemistry 48(5), (2000), 1692-1696) beschriebenen Methode bestimmt werden.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht die genetische Modifikation in der Einführung eines oder mehrerer fremder
 10 Nucleinsäuremoleküle, deren Vorhandensein und/oder Expression zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden Asparagin-Synthetase-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

15 Der Begriff des „fremden Nucleinsäuremoleküls“ hat hierbei die bereits oben definierte Bedeutung.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das fremde Nucleinsäuremolekül, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- 20 (a) DNA-Molekülen, die mindestens eine antisense-RNA codieren, welche eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die Asparagin-Synthetase-Proteine codieren;
- (b) DNA-Molekülen, die über einen Cosuppressionseffekt zu Verringerung der Expression von endogenen Genen führen, die Asparagin-Synthetase-Proteine
 25 codieren;
- (c) DNA-Molekülen, die mindestens ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte von endogenen Genen spaltet, die Asparagin-Synthetase-Proteine codieren;
- (d) Mittels in vivo-Mutagenese eingeführter Nucleinsäuremoleküle, die zu einer
 30 Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in endogenen Asparagin-Synthetase-Protein codierenden Genen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven Asparagin-Synthetase-Protein bewirkt;
- (e) DNA-Molekülen, die simultan mindestens eine antisense-RNA und mindestens
 35 eine sense-RNA codieren, wobei besagte antisense-RNA und besagte sense-

RNA ein doppelsträngiges RNA-Molekül ausbilden, das eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die Asparagin-Synthetase-Proteine codieren;

(f) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, wobei die Integration der Transposonsequenzen zu einer Mutation oder einer Insertion in endogenen Asparagin-Synthetase-Proteinen codierenden Genen führt, welche zu einer Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven Asparagin-Synthetase-Proteinen bewirkt; und

(g) T-DNA Moleküle, die durch Insertion in endogenen Asparagin-Synthetase - Protein codierenden Genen eine Verringerung der Expression von Asparagin-Synthetase -Protein codierenden Genen oder die Synthese von inaktiven Asparagin-Synthetase-Proteinen bewirkt.

In diesem Zusammenhang gelten die bereits oben in anderem Zusammenhang getroffenen allgemeinen Aussagen zur Durchführung der gentechnischen Ansätze (antisense-, cosuppressions- und Ribozym-Technologie, in-vivo-Mutagenese, Transposons, T-DNA Insertion) für die genetische Modifizierung der Asparagin-Synthetase-Aktivität entsprechend.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens führt die genetische Modifikation zu einer Erhöhung der Aktivität eines ADP-Glukose Pyrophosphorylase-Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

Die Bestimmung der ADP-Glukose Pyrophosphorylase-Aktivität kann erfolgen, wie beispielsweise bei Müller-Röber et al. (EMBO J. 11, (1992), 1229-1238) beschrieben.

Unter einem „ADP-Glukose Pyrophosphorylase-Protein“ wird im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Protein verstanden, das die Umwandlung von Glukose-1-Phosphat und ATP in ADP-Glukose und Pyrophosphat katalysiert.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht die genetische Modifikation in der Einführung eines oder mehrerer fremder Nucleinsäuremoleküle, deren Vorhandensein und/oder Expression zur Erhöhung der Aktivität eines oder mehrerer in der Pflanzenzelle vorkommenden ADP-Glukose

Pyrophosphorylase-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

Der Begriff des „fremden Nucleinsäuremoleküls“ hat hierbei die bereits oben definierte
5 Bedeutung.

Vorzugsweise kodiert das fremde Nucleinsäuremolekül eine deregulierte ADP-Glukose Pyrophosphorylase, besonders bevorzugt ist die ADP-Glukose Pyrophosphorylase aus E. coli, die als glgC16 bezeichnet wird und die bei Expression in transgenen
10 Kartoffelpflanzen zu einer gesteigerten Stärkesyntheserate führt. Kaltgelagerte Kartoffelknollen dieser Pflanzen zeigen eine deutlich verringerte Akkumulation von Hexosen (Stark et al., Science 258, (1992), 287-292; Stark et al., Ann. NY Acad. Sci. 792, (1996), 26-37).

15 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung des oben beschriebenen pflanzlichen Materials, das in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden kann, zur Herstellung von wärmebehandelten Lebensmitteln, welche im Vergleich zu entsprechenden herkömmlichen wärmebehandelten Lebensmitteln einen verringerten Acrylamidgehalt aufweisen.

20 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von pflanzlichem Material, das im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichen pflanzlichen Material einen verringerten Gehalt an löslichen Zuckern und/oder Aminosäuren aufweist, zur Herstellung von wärmebehandelten Lebensmitteln mit
25 verringertem Acrylamidgehalt.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung des oben beschriebenen pflanzlichen Materials, das in den erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden kann, zur Verringerung des Acrylamidgehaltes von
30 wärmebehandelten Lebensmitteln.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung von pflanzlichem Material, das für die Herstellung von wärmebehandelten Lebensmitteln mit einem verringerten Acrylamidgehalt geeignet ist,
35 umfassend:

- a) die Bestimmung des Gehaltes an löslichen Zuckern und/oder Aminosäuren von pflanzlichem Material, das zur Herstellung von wärmebehandelten Lebensmitteln geeignet ist; und
- b) die Auswahl solchen pflanzlichen Materials gemäß Verfahrensschritt a), das im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichen pflanzlichen Material einen verringerten Gehalt an löslichen Zuckern und/oder Aminosäuren aufweist.

Methoden:

Bestimmung von Glukose, Fruktose und Saccharose:

Zur Bestimmung des Glukose-, Fruktose- bzw. Saccharose-Gehaltes von Kartoffelknollen werden kleine Knollenstückchen (Durchmesser ca. 10 mm) von Kartoffelknollen in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend für eine Stunde bei 80 °C in 0,5 ml 80 % (Vol./Vol.) Ethanol extrahiert. Nach Zentrifugation (3 min., 3000 rpm) wird der Überstand abgenommen und der Niederschlag erneut in 0,5 ml 80 % (Vol./Vol.) Ethanol extrahiert. Dieser Vorgang wird wiederholt. Die vereinigten Überstände werden zu Bestimmung der Menge an löslichen Zuckern verwendet.

Die quantitative Bestimmung von löslicher Glukose, Fruktose und Saccharose wird in einem Ansatz mit folgender Zusammensetzung durchgeführt:

100 mM Imidazol/HCl (pH 6,9)

5 mM MgCl₂

2 mM NAD⁺

1 mM ATP

200 µl Probe

2 Units Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (aus *Leuconostoc mesenteroides*)

Der Ansatz wird für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung der Zucker erfolgt anschließend mittels gängiger photometrischer Methoden durch Messung der Absorption bei 340 nm nach der aufeinanderfolgenden Zugabe von

1500 Units Hexokinase aus Hefe (zur Bestimmung von Glukose)

2,5 Units Phosphoglucisomerase aus Hefe (zur Bestimmung von Fruktose)

350 Units β-Fructosidase aus Hefe (zur Bestimmung von Saccharose) zu einem

Reaktionsvolumen von 200 µl.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

5

Beispiel 1

Herstellung von Kartoffelchips und Pommes Frites aus Kartoffelknollen

10 Zur Herstellung von Kartoffelchips und Pommes Frites wurden reife Kartoffelknollen von transgenen Kartoffelpflanzen, die eine verminderte Expression des R1-Gens (Lorberth et al., Nature Biotechnology 16, (1998), 473-477) sowie Kartoffelknollen von Kartoffelpflanzen, die eine verminderte R1-Genexpression und zusätzlich eine verminderte Branching Enzyme I-Genexpression aufweisen (WO97/11188), verwendet. Die weitere Verarbeitung zu Chips bzw. Pommes Frites erfolgte sofort nach der Ernte
15 als auch nach unterschiedlich langer Lagerung bei 4°C.

Die Knollen wurden mit der Hand geschält und anschließend in einer Schneidemaschine (Modell Chef200, Firma Saro Emmerich, Deutschland) für die Herstellung von Chips in Scheiben bzw. mit einem Stanzer (Weisser, Deutschland) zu
20 Pommes Frites geschnitten.

Frittiert wurden die Proben in einer Friteuse (Frita4, Franke, Frifri aro GmbH, Deutschland) unterschiedlich lange mit Pflanzenfett (Palmaja, Meylip mbH & Co.KG, Deutschland) bei einer Temperatur von 180°C.
25

Die frittierten Produkte wurden anschließend zerkleinert und auf ihren Gehalt an Acrylamid hin untersucht. Der Nachweis erfolgte mittels GC/MS oder LC/MS-MS nach Derivatisierung (Epa-Methode 8032a, U.S. Enviromental Protection Agency). Dies gewährleistet neben einer niedrigen Bestimmungsgrenze eine hohe Selektivität des
30 Nachweises.

Es konnte bei allen frittierten Proben gezeigt werden, dass der Gehalt an Acrylamid in den transgenen Kartoffelknollen um mindestens 15% verringert war im Vergleich zum Acrylamidgehalt der Knollen der entsprechenden Wildtyp-Pflanzen.
35

Beispiel 2

Bestimmung des Acrylamidgehaltes von Kartoffelchips und Pommes Frites, die aus Kartoffelknollen mit verminderter R1- und Branching Enzyme I - Genexpression hergestellt wurden.

Die gemäß Beispiel 1 erzeugten Kartoffelchips und Pommes Frites wurden auf ihren Acrylamidgehalt hin untersucht.

Nicht genetisch modifizierte Pflanzen werden im folgenden als Wildtyp-Pflanzen bezeichnet. Die transgenen Kartoffelpflanzen, die eine verminderte Expression des R1-Gens (Lorberth et al., Nature Biotechnology 16, (1998), 473-477) und zusätzlich eine verminderte Branching Enzyme I - Genexpression aufweisen (siehe internationale Patentanmeldung WO97/11188) werden im weiteren als 015VL001 bezeichnet.

Setzt man frisch geerntete Knollen von Kartoffelpflanzen zum Frittieren bei 180°C für 3 bzw. 6 Minuten ein, so weisen die Kartoffelchips folgende Acrylamidgehalte auf:

	Chips Frittierdauer 3 min	Chips Frittierdauer 6 min
Wildtyp	100%	100%
015VL001	31%	49%

Tab.1: Prozentualer Gehalt an Acrylamid von Chips (hergestellt aus Kartoffelknollen direkt nach erfolgter Ernte). Der Wildtyp wurde auf 100 % gesetzt.

Der absolute Acrylamidgehalt steigt mit steigender Frittierdauer stark an. Dies ist sowohl für Chips aus Wildtypknollen, als auch für Chips aus transgenen Knollen der Fall. Bei beiden Frittierdauern ist die Steigerung des Gehaltes an Acrylamid in den Chips, die aus den transgenen Kartoffelknollen hergestellt wurden, jedoch deutlich reduziert gegenüber den Chips von Wildtyp-Pflanzen. Bei einer Frittierdauer von 3 min ist der Acrylamidgehalt in den transgenen Chips um ca. 70 % gegenüber den

Wildtypchips reduziert. Bei einer Frittierdauer von 6 min. kommt es zu einer Reduktion der Acrylamidbildung in den transgenen Chips von ca. 50 % gegenüber dem Wildtyp.

In einem weiteren Versuch wurden bei 4 °C-gelagerte Kartoffelknollen zur Herstellung von Kartoffelchips verwendet. Nach der Ernte wurden die transgenen Knollen und die zugehörigen Wildtypknollen für 56 Tage bei 4 °C gelagert. Es wurden Kartoffelchips und Pommes Frites, hergestellt und bei 180 °C unterschiedlich lange unter den oben angegebenen Bedingungen frittiert:

	Chips Frittierdauer 3 min	Chips Frittierdauer 6 min
Wildtyp	100 %	100%
015VL001	26%	28%

Tab. 2: Prozentualer Gehalt an Acrylamid von Chips (hergestellt aus bei 4°C-gelagerten Knollen). Der Wildtyp wurde auf 100 % gesetzt.

Grundsätzlich steigt der absolute Acrylamidgehalt in den Produkten aus 4°C-gelagerten Kartoffeln stark an. Es zeigt sich jedoch, dass der Gehalt an Acrylamid in den Chips aus transgenen Kartoffelknollen um ca. 70 % weniger ansteigt im Vergleich zu den Chips aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzen, sowohl bei einer Frittierdauer von 3 min. als auch bei einer Frittierdauer von 6 min.

In einem weiteren Versuch wurden aus kaltgelagerten Kartoffelknollen (für 56 Tage bei 4 °C gelagert) Pommes Frites, wie in Beispiel 1 beschrieben, hergestellt und frittiert. Im Gegensatz zu den Kartoffelchips wurden die Pommes Frites für 30 Sekunden bei 180°C vorfrittiert, auf Küchenpapier ausgelegt und auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend erst für die angegebene Zeit frittiert.

	Pommes Frites Frittierdauer 3 min	Pommes Frites Frittierdauer 6 min
Wildtyp	100%	100%
015VL001	55%	42%

Tab.3: Prozentualer Gehalt an Acrylamid von Pommes Frites (hergestellt aus kaltgelagerten Knollen). Der Wildtyp wurde auf 100 % gesetzt.

- 5 Die absoluten Acrylamidgehalte sind in den Pommes Frites geringer im Vergleich zu Kartoffelchips. Dies ist wohl in erster Linie auf die geringere Oberfläche der Pommes Frites im Vergleich zu den Kartoffelchips pro kg Kartoffel zurückzuführen. Die prozentualen Acrylamidgehalte zeigen auch bei diesem Produkt eine Reduktion in den Pommes Frites aus transgenen Kartoffelpflanzen um ca. 50 % bei beiden Frittierdauern
- 10 gegenüber Pommes Frites aus Wildtypknollen.

Im Rahmen der industriellen Chips- bzw. Pommes-Frites-Herstellung werden die geschnittenen Kartoffeln vor dem Frittieren blanchiert. Das Blanchieren kann in einem Wasser- oder Dampfblancheur geschehen. Die Blanchierbedingungen sind keine

15 feststehenden Werte, sondern variieren sehr stark je nach der Qualität der eingesetzten Kartoffeln. Beim Blanchieren werden lösliche Zucker zum Teil herausgewaschen. Dies bewirkt ein gleichmäßigeres Bräunen der Kartoffelprodukte beim Frittieren.

Um zu zeigen, dass das erfindungsgemäße Verfahren auch unter veränderten

20 Prozessbedingungen zu einer Verringerung der Acrylamidbildung in den Kartoffelprodukten aus transgenen Kartoffelpflanzen führt im Vergleich zu den Produkten aus entsprechenden Wildtypknollen, wurde das Blanchieren im Labormaßstab durch das Waschen der geschnittenen Kartoffeln mit warmen Leitungswasser nachvollzogen.

25

Hierzu wurden ca. 200 g Kartoffeln (nach der Ernte für 56 Tage bei 4°C gelagert) dreimal mit je 5 Liter 45°C warmen Leitungswasser für je 1,5 Minuten gewaschen. Anschließend wurden die geschnittenen Kartoffeln auf Haushaltspapier getrocknet und wie oben beschrieben für 3 Minuten bei 180°C frittiert:

30

	Chips Frittierdauer 3 min
Wildtyp	100 %
015VL001	21 %

Tab.4: Prozentualer Gehalt an Acrylamid von gewaschenen Chips (hergestellt aus Kartoffelknollen). Der Wildtyp wurde auf 100 % gesetzt.

- 5 Das Waschen führt zu einer Reduktion der Bildung an Acrylamid in Chips, die aus Kartoffelknollen von Wildtyp-Pflanzen hergestellt wurden, um ca. 16 % gegenüber nicht gewaschenen Kartoffelchips.

10 Im Vergleich zu den „gewaschenen“ Chips, die aus Kartoffelknollen von Wildtyp-Pflanzen hergestellt wurden, weisen die „gewaschenen“ Chips, die aus Kartoffelknollen der transgenen Kartoffelpflanzen hergestellt wurden, eine um ca. 80% verringerte Acrylamidbildung auf.

15 In einer weiteren Analyse wurden die Gehalte an löslichen Zuckern, insbesondere an Glukose und/oder Fruktose, im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichen pflanzlichen Material von Wildtyp-Pflanzen bestimmt:

20 Hierzu wurden die Kartoffelknollen geschält und mit einem Korkbohrer (Firma Roth) eine Probe mit einem Durchmesser von ca. 0.5 cm Probe ausgestochen. Von dieser Probe wurde vom Anfang, einem Viertel und der Hälfte jeweils eine ca. 2 mm dicke Scheibe von je 5 verschiedenen Knollen in einem Reaktionsgefäß vereint und zur Bestimmung der löslichen Zucker eingesetzt.

25 Die Bestimmung des Gehaltes an Zuckern, insbesondere von Fruktose und Glukose, von pflanzlichem Material sind dem Fachmann bekannt und wurden, wie weiter oben beschrieben, durchgeführt.

	Wildtyp direkt nach der Ernte	015VL001 direkt nach der Ernte	Wildtyp nach Lagerung bei 4°C	015VL001 nach Lagerung bei 4°C
Glukose [μmol/gFG]	100 %	61 %	100 %	48 %
Fruktose [μmol/gFG]	100 %	67 %	100 %	53 %
Sucrose (= Saccharose) [μmol/gFG]	100 %	110 %	100 %	69 %

Tab. 6: Vergleich der prozentualen Gehalte an löslichen Zuckern von frisch geernteten und gelagerten Knollenproben bezogen auf Knollen des entsprechenden Wildtyps (100%).

5

Durch die Lagerung kommt es zu einem starken Anstieg des Gehaltes an löslichen Zuckern in Wildtyp-Pflanzen. Die Knollen der Linie 015VL zeigen direkt nach der Ernte um ca. 30%-40 % reduzierte Gehalte an Glukose bzw. Fruktose im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen. Nach der oben beschriebenen Kaltlagerung kommt es zu einer Reduktion von Glukose bzw. Fruktose um ca. 50 % in den transgenen Pflanzen gegenüber den entsprechenden Wildtyp-Pflanzen.

10

Korreliert man den Gehalt an Glukose bzw. Fruktose mit dem Gehalt an Acrylamid in Chips, so erkennt man, dass eine lineare Korrelation zwischen dem Gehalt an Glukose bzw. Fruktose in der Kartoffelknolle und der Bildung an Acrylamid in dem frittierten Produkt Chips besteht.

15

Es konnte somit erstmals gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen der Bildung an Acrylamid in wärmebehandelten Lebensmitteln und dem Gehalt an löslichen Zuckern des zur Herstellung des wärmebehandelten Lebensmittels eingesetzten pflanzlichen Materials besteht.

20

Beispiel 3

Bestimmung des Acrylamidgehaltes von Kartoffelchips und Pommes Frites, die aus Kartoffelknollen mit verminderter R1-Genexpression hergestellt wurden.

Die gemäß Beispiel 1 erzeugten Kartoffelchips und Pommes Frites, die aus Kartoffelknollen mit verminderter R1-Genexpression hergestellt wurden, wurden auf ihren Acrylamidgehalt hin untersucht.

Hierbei wurden, wie bereits in Beispiel 2 beschrieben, zum einen unterschiedliche Frittierdauern ausgetestet als auch unterschiedlich gelagerte bzw. gewaschene Proben untersucht.

Die in Beispiel 2 beschriebenen Ergebnisse konnten bestätigt werden, d.h. Kartoffelchips und Pommes Frites, die aus Kartoffelknollen mit verminderter R1-Genexpression hergestellt wurden, weisen unter den in Beispiel 2 näher beschriebenen Bedingungen ebenfalls weniger Acrylamid auf im Vergleich zu entsprechenden Produkten, die aus Kartoffelknollen von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen hergestellt wurden.

Beispiel 4

Herstellung unterschiedlicher Varietäten transgener Kartoffelpflanzen, die eine verringerte Genexpression eines R1-Gens aufweisen

Zur Erzeugung transgener Kartoffelpflanzen, die eine verringerte Expression eines R1-Gens aufweisen, wurde die T-DNA des Plasmids IR5/29 mit Hilfe von Agrobakterien, wie bei Rocha-Sosa et al. (EMBO J. 8, (1989), 23-29) beschrieben, in Kartoffelpflanzen der Varietäten Tomensa, Solara und Bintje transferiert.

Angaben zum Vektor IR5-29:

IR5-29 ist ein Derivat des Plasmides pGSV71, welches u.a. die Sequenz des Promotors des Patatin Gens B33 aus *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa et al., (1989), siehe oben) und die komplette R1-cDNA (Lorberth et al. *Nature Biotechnology* 16, (1998), 473 – 477) in „sense“-Orientierung zum Promotor enthält.

pGSV71 ist ein Derivat des Plasmides pGSV7, welches sich vom intermediären Vektor pGSV1 ableitet. pGSV1 stellt ein Derivat von pGSC1700 dar, dessen Konstruktion von Cornelissen und Vanderwiele ((1989), *Nuclear transcriptional activity of the tobacco plastid psbA promotor. Nucleic Acids Research* 17: 19-29) beschrieben wurde. pGSV1 wurde aus pGSC1700 durch Deletion des Carbenicillin Resistenzgens sowie Deletion der T-DNA-Sequenzen der TL-DNA-Region des Plasmides pTiB6S3 erhalten.

pGSV7 enthält den Replikationsursprung des Plasmides pBR322 (Bolivar et al., (1977), *Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene*, 2: 95-113) sowie den Replikationsursprung des *Pseudomonas*-Plasmides pVS1 (Itoh et al., (1984), *Genetic and molecular characterization of the Pseudomonas plasmid pVS1. Plasmid* 11: 206-220).

pGSV7 enthält außerdem das selektierbare Markergen *aadA*, aus dem Transposon Tn1331 aus *Klebsiella pneumoniae*, welches Resistenz gegenüber den Antibiotika Spectinomycin und Streptomycin verleiht (Tolmasky, (1990), *Sequencing and expression of aadA, bla, and tnpR from the multiresistance transposon Tn1331. Plasmid*. 24 (3): 218-226; Tolmasky and Crosa, (1993), *Genetic organization of antibiotic resistance genes (aac(6')-Ib, aadA, and oxa9) in the multiresistance transposon Tn1331. Plasmid*. 29 (1): 31-40).

Das Plasmid pGSV71 wurde erhalten durch Klonierung eines chimären *bar*-Gens zwischen die Borderregionen von pGSV7. Das chimäre *bar*-Gen enthält die Promotorsequenz des Blumenkohlmosaikvirus zur Initiation der Transkription (Odell et al., (1985), *Identification of DNA sequences required for activity of the Cauliflower Mosaic Virus 35S promotor. Nature* 313: 810-812), das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., (1987), *Characterization of the herbicide resistance gene bar from Streptomyces hygroscopicus. The EMBO Journal*, 6: 2519-2523) und den 3'-untranslatierten Bereich des Nopalinsynthasegens der T-DNA von pTiT37, zur Termination der Transkription und Polyadenylierung. Das *bar*-Gen vermittelt Toleranz gegenüber dem Herbizid Glufosinat-Ammonium.

Die T-DNA enthält folgende Elemente in angeführter Reihenfolge:

- die linke Randsequenz der TL-DNA aus pTiB6S3 (Gielen et al., (1984), The complete nucleotide sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. *The EMBO J.* 3:835-846).
- den Promotor des Patatin Gens B33 aus *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa et al., 1989, siehe oben) in „sense“-Orientierung bezogen auf die linke Randsequenz der TL-DNA
- die komplette R1-cDNA (Lorberth et al., (1998), siehe oben) in „sense“-Orientierung bezogen auf den Patatin - Promotor
- das Polyadenylierungssignal (3'-Ende) des Octopin Synthase-Gens (Gen 3) der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., (1984), siehe oben) in „sense“-Orientierung bezogen auf die linke Randsequenz der TL-DNA
- das TaqI-Fragment des nicht-translatierten 3'-Endes des Nopalinsynthase-Gens (3'nos) aus der T-DNA des Plasmides pTIT37 (Depicker et al., (1982), Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *Journal of molecular and applied Genetics* 1: 561-573) in „antisense“-Orientierung bezogen auf die linke Randsequenz der TL-DNA
- die kodierende Sequenz des Phosphinothricin-Resistenzgens (bar) aus *Streptomyces hygrosopicus* (Thompson et al. (1987, siehe oben) in „antisense“-Orientierung bezogen auf die linke Randsequenz der TL-DNA. Die zwei endständigen Codons am 5'-Ende des bar-Wildtyp-Gens wurden ersetzt durch die Codons ATG und GAC.
- die P35S3 Promotor-Region des Blumenkohl-Mosaik-Virus (Odell et al., (1985), siehe oben) in „antisense“-Orientierung bezogen auf die linke Randsequenz der TL-DNA
- die rechte Randsequenz der TL-DNA aus dem Plasmid pTiB6S3 (Gielen et al., (1984), siehe oben.

Nach der Transformation der verschiedenen Kartoffelvarietäten konnten mittels Western-Blot-Analyse (Lorberth et al., *Nature Biotechnology* 16, (1998), 473 – 477) für jede der Varietäten verschiedene Linien identifiziert werden, deren Knollen aufgrund eines Cosuppressions - Effektes eine deutlich verringerte Menge an R1-Protein aufwiesen.

Die durch Transformation mit dem Plasmid IR5/29 erhaltenen Pflanzen der Varietät Tomensa wurden als 093IR-Pflanzen, die der Varietät Solara als 095IR-Pflanzen und die der Varietät Bintje als 092IR-Pflanzen bezeichnet.

Für die Herstellung von Pommes frites (Beispiel 5) wurden Kartoffelknollen der Linien
5 093IR360, 095IR049 und 092IR002 verwendet.

Beispiel 5

10

Bestimmung des Acrylamidgehaltes von Pommes frites, die aus Kartoffelknollen unterschiedlicher Varietäten mit verminderter R1 - Genexpression hergestellt wurden

15 Frisch geerntete Kartoffelknollen der gemäß Beispiel 4 erzeugten Pflanzen wurden gemäß Beispiel 1 zu Pommes frites verarbeitet und gemäß Beispiel 2 für 30 Sekunden bei 180°C vorfrittiert, auf Küchenpapier ausgelegt und auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend für 3 Minuten bei 180°C frittiert.

20 Die hergestellten Pommes frites wiesen folgende Acrylamidgehalte auf:

	Wildtyp Tomena	093IR360	Wildtyp Solara	095IR049	Wildtyp Bintje	092IR002
Acrylamidgehalt [%]	100%	62%	100%	56%	100%	64%

25 Tab.1: Prozentualer Gehalt an Acrylamid von Pommes frites (hergestellt aus Kartoffelknollen direkt nach erfolgter Ernte). Der jeweils entsprechende Wildtyp wurde auf 100 % gesetzt.

Die absoluten Acrylamidgehalte der hergestellten Pommes frites variieren zum Teil erheblich zwischen den verwendeten Varietäten. Dies ist in erster Linie auf die
30 unterschiedlichen Absolutwerte der löslichen Zucker zurückzuführen. So zeigten zum

Beispiel Pommes frites der Sorte Solara sowohl die höchsten Acrylamidwerte als auch die höchsten Gehalte an löslichen Zuckern.

Die relativen Acrylamidgehalte der Pommes frites zeigen jedoch bei allen verwendeten transgenen Varietäten eine deutliche Reduktion der Menge an Acrylamid um ca. 40-50% gegenüber Pommes frites, die aus Wildtypknollen hergestellt wurden.

In einer weiteren Analyse wurden die Gehalte an löslichen Zuckern, insbesondere an Glukose, Fruktose und Saccharose, in den Kartoffelknollen der verschiedenen Varietäten bestimmt:

Hierzu wurden gemäß Beispiel 2 die Kartoffelknollen geschält, und mit einem Korkbohrer (Firma Roth) wurde eine Probe mit einem Durchmesser von ca. 0.5 mm Probe ausgestochen. Von dieser Korkbohrer-Probe wurde vom Anfang, einem Viertel und der Hälfte jeweils eine ca. 2 mm dicke Scheibe von je 5 verschiedenen Knollen in einem Reaktionsgefäß vereint und zur Bestimmung der löslichen Zucker eingesetzt.

Die Bestimmung des Gehaltes an Zuckern, insbesondere von Fruktose und Glukose, von pflanzlichem Material wurde wie weiter oben beschrieben durchgeführt.

Wie bereits oben erwähnt, variieren die absoluten Werte der löslichen Zucker zwischen den untersuchten Varietäten stark.

Die Varietät Solara zeigt die höchsten Glukose-, Fruktose- und Saccharose - Gehalte. Tomensa zeigt die niedrigsten Glukose und Fruktose - Gehalte, Bintje die niedrigsten Saccharose-Gehalte. Die Knollen der Linie 093IR360 zeigen direkt nach der Ernte um ca. 30-40 % reduzierte Gehalte an Glukose bzw. Saccharose im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyppflanzen. Die Knollen der Linie 095IR049 zeigen direkt nach der Ernte um ca. 10-30 % reduzierte Gehalte an Glukose bzw. Fruktose im Vergleich zu Wildtyppflanzen.

Korreliert man den Gesamtgehalt an Glukose und / oder Fruktose mit dem Gehalt an Acrylamid in Pommes frites, so erkennt man, dass eine lineare Korrelation zwischen dem Gehalt an Glukose und / oder Fruktose und der Bildung an Acrylamid in den Pommes frites besteht.

Es konnte somit für verschiedene Varietäten bestätigt werden, dass die Verwendung von Kartoffelpflanzen mit verringerter R1-Genexpression die Herstellung von wärmebehandelten Lebensmitteln, insbesondere von Pommes frites, erlaubt, welche sich durch einen deutlich verringerten Gehalt an Acrylamid auszeichnen im Vergleich zu
5 entsprechenden wärmebehandelten Lebensmitteln, die aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyppflanzen erzeugt werden.

10

15

20

25

30

35

1. Verfahren zur Verringerung des Acrylamidgehaltes von wärmebehandelten
Lebensmitteln im Vergleich zu entsprechenden herkömmlichen wärmebehandelten
Lebensmitteln umfassend:
 - (a) die Auswahl von pflanzlichem Material, das im Vergleich zu entsprechendem
herkömmlichen pflanzlichen Material einen verringerten Gehalt an löslichen
Zuckern und/oder Aminosäuren aufweist;
 - (b) die Verarbeitung besagten pflanzlichen Materials zu einem Lebensmittel; und
 - (c) die Wärmebehandlung des in Verfahrensschritt b) erzeugten Lebensmittels.
2. Verfahren nach Anspruch 1, worin besagter Acrylamidgehalt um mindestens 15%
verringert ist im Vergleich zum Acrylamidgehalt von entsprechenden
herkömmlichen wärmebehandelten Lebensmitteln.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, worin besagter Gehalt an löslichen Zuckern um
mindestens 10% verringert ist im Vergleich zum Gehalt an löslichen Zuckern von
entsprechendem herkömmlichen pflanzlichen Material.
4. Verfahren nach Anspruch 3, worin der lösliche Zucker Glukose und/oder Fruktose ist.
5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, worin besagter Gehalt an Aminosäuren um
mindestens 10% verringert ist im Vergleich zum Gehalt an Aminosäuren von
entsprechendem herkömmlichen pflanzlichen Material.
6. Verfahren nach Anspruch 5, worin die Aminosäure Asparagin ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, worin besagte Wärmebehandlung bei
Temperaturen von mindestens 100°C erfolgt.
8. Verfahren nach Anspruch 7, worin besagte Wärmebehandlung bei Temperaturen
von 110° C bis 230° C erfolgt.
9. Verfahren nach Anspruch 1, worin besagte Lebensmittel ausgewählt sind aus der
Gruppe bestehend aus Kartoffelchips, Pommes Frites, Kartoffelpuffer, Keksen,
Krackern, Knäckebrot, Frühstückscerealien, Maischips (Tacos), Pop Corn,
Brotchips, Waffeln, Salzstangen, Kaffee, Brot, Brötchen, Kuchen, Reischips und
Toastbrot.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 8, worin besagte Lebensmittel
ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Kartoffelchips, Pommes Frites,
Kartoffelpuffer, Keksen, Krackern, Knäckebrot, Frühstückscerealien, Maischips
(Tacos), Pop Corn, Brotchips, Waffeln, Salzstangen, Kaffee, Brot, Brötchen,
Kuchen, Reischips, Pizza und Toastbrot.

11. Verfahren nach Anspruch 1 oder 9, worin das verwendete pflanzliche Material dadurch gekennzeichnet ist, dass es genetisch modifiziert ist, wobei die genetische Modifikation zu einer Verringerung des Gehaltes an löslichen Zuckern führt im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichen pflanzlichen Material von Wildtyp-Pflanzen.
5
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 8 und 10, worin das verwendete pflanzliche Material dadurch gekennzeichnet ist, dass es genetisch modifiziert ist, wobei die genetische Modifikation zu einer Verringerung des Gehaltes an löslichen Zuckern führt im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichen pflanzlichen Material von Wildtyp-Pflanzen.
10
13. Verfahren nach Anspruch 11, worin besagte genetische Modifikation zu einer Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden R1-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.
- 15 14. Verfahren nach Anspruch 12, worin besagte genetische Modifikation zu einer Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden R1-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.
- 20 15. Verfahren nach Anspruch 11, worin besagte genetische Modifikation zu einer Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden Invertase-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.
- 25 16. Verfahren nach Anspruch 12, worin besagte genetische Modifikation zu einer Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden Invertase-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.
- 30 17. Verfahren nach Anspruch 13, worin besagte genetische Modifikation in der Einführung eines oder mehrerer fremder Nucleinsäuremoleküle besteht, deren Vorhandensein und/oder Expression zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden R1-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.
- 35 18. Verfahren nach Anspruch 14, worin besagte genetische Modifikation in der Einführung eines oder mehrerer fremder Nucleinsäuremoleküle besteht, deren Vorhandensein und/oder Expression zur Verringerung der Aktivität eines oder

mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden R1-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

19. Verfahren nach Anspruch 17, worin besagte fremde Nucleinsäuremoleküle ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

- (a) DNA-Molekülen, die mindestens eine antisense-RNA codieren, welche eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die R1-Proteine codieren;
- (b) DNA-Molekülen, die über einen Cosuppressionseffekt zu Verringerung der Expression von endogenen Genen führen, die R1-Proteine codieren;
- (c) DNA-Molekülen, die mindestens ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte von endogenen Genen spaltet, die R1-Proteine codieren;
- (d) mittels in vivo-Mutagenese eingeführter Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in endogenen R1-Proteinen codierenden Genen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven R1-Proteinen bewirkt;
- (e) DNA-Molekülen, die simultan mindestens eine antisense-RNA und mindestens eine sense-RNA codieren, wobei besagte antisense-RNA und besagte sense-RNA ein doppelsträngiges RNA-Molekül ausbilden, das eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die R1-Proteine codieren;
- (f) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, wobei die Integration der Transposonsequenzen zu einer Mutation oder einer Insertion in endogenen R1-Proteinen codierenden Genen führt, welche zu einer Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven R1-Proteinen bewirkt; und
- (g) T-DNA Moleküle, die durch Insertion in endogenen R1-Protein codierenden Genen eine Verringerung der Expression von R1-Protein codierenden Genen oder die Synthese von inaktiven R1-Proteinen bewirkt.

20. Verfahren nach Anspruch 18, worin besagte fremde Nucleinsäuremoleküle ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

- (a) DNA-Molekülen, die mindestens eine antisense-RNA codieren, welche eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die R1-Proteine codieren;

- (b) DNA-Molekülen, die über einen Cosuppressionseffekt zu Verringerung der Expression von endogenen Genen führen, die R1-Proteine codieren;
- (c) DNA-Molekülen, die mindestens ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte von endogenen Genen spaltet, die R1-Proteine codieren;
- 5 (d) mittels in vivo-Mutagenese eingeführter Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in endogenen R1-Proteinen codierenden Genen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven R1-Proteinen bewirkt;
- 10 (e) DNA-Molekülen, die simultan mindestens eine antisense-RNA und mindestens eine sense-RNA codieren, wobei besagte antisense-RNA und besagte sense-RNA ein doppelsträngiges RNA-Molekül ausbilden, das eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die R1-Proteine codieren;
- 15 (f) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, wobei die Integration der Transposonsequenzen zu einer Mutation oder einer Insertion in endogenen R1-Proteinen codierenden Genen führt, welche zu einer Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven R1-Proteinen bewirkt; und
- 20 (g) T-DNA Moleküle, die durch Insertion in endogenen R1-Protein codierenden Genen eine Verringerung der Expression von R1-Protein codierenden Genen oder die Synthese von inaktiven R1-Proteinen bewirkt.

21. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, worin besagte genetische Modifikation in der Einführung eines oder mehrerer fremder Nucleinsäuremoleküle besteht, deren
 25 Vorhandensein und/oder Expression zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden Invertase-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

22. Verfahren nach Anspruch 21, worin besagte fremde Nucleinsäuremoleküle
 30 ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

- (a) DNA-Molekülen, die einen Invertase-Inhibitor codieren.
- (b) DNA-Molekülen, die mindestens eine antisense-RNA codieren, welche eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die Invertase-Proteine codieren;

- (c) DNA-Molekülen, die über einen Cosuppressionseffekt zu Verringerung der Expression von endogenen Genen führen, die Invertase-Proteine codieren;
- (d) DNA-Molekülen, die mindestens ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte von endogenen Genen spaltet, die Invertase-Proteine codieren;
- 5 (e) mittels in vivo-Mutagenese eingeführter Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in endogenen Invertase-Proteinen codierenden Genen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven Invertase-Proteinen bewirkt;
- 10 (f) DNA-Molekülen, die simultan mindestens eine antisense-RNA und mindestens eine sense-RNA codieren, wobei besagte antisense-RNA und besagte sense-RNA ein doppelsträngiges RNA-Molekül ausbilden, das eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die Invertase-Proteine codieren;
- 15 (g) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, wobei die Integration der Transposonsequenzen zu einer Mutation oder einer Insertion in endogenen Invertase-Proteinen codierenden Genen führt, welche zu einer Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven Invertase - Proteinen bewirkt; und
- 20 (h) T-DNA Moleküle, die durch Insertion in endogenen Invertase -Protein codierenden Genen eine Verringerung der Expression von Invertase -Protein codierenden Genen oder die Synthese von inaktiven Invertase -Proteinen bewirkt.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8 oder 11 bis 22, worin besagtes Pflanzenmaterial von Kartoffelpflanzen stammt.

24. Verfahren nach Anspruch 23, worin besagte wärmebehandelte Lebensmittel ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Pommer Frites, Kartoffelchips und Kartoffelpuffer.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 9, worin das verwendete pflanzliche Material dadurch gekennzeichnet ist, dass es genetisch modifiziert ist, wobei die genetische Modifikation zu einer Verringerung des Gehaltes an Aminosäuren führt im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichen pflanzlichen Material von Wildtyp-Pflanzen.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 8 oder 10, worin das verwendete pflanzliche Material dadurch gekennzeichnet ist, dass es genetisch modifiziert ist,

wobei die genetische Modifikation zu einer Verringerung des Gehaltes an Aminosäuren führt im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichen pflanzlichen Material von Wildtyp-Pflanzen.

27. Verfahren nach Anspruch 25 oder 26, wobei die genetische Modifikation zu einer Verringerung des Gehaltes an Asparagin führt im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichen pflanzlichen Material von Wildtyp-Pflanzen.

28. Verfahren nach Anspruch 25, 26 oder 27, worin besagte genetische Modifikation zu einer Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden Asparagin-Synthetase-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

29. Verfahren nach Anspruch 28, worin besagte genetische Modifikation in der Einführung eines oder mehrerer fremder Nucleinsäuremoleküle besteht, deren Vorhandensein und/oder Expression zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden Asparagin-Synthetase-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

30. Verfahren nach Anspruch 29, worin besagte fremde Nucleinsäuremoleküle ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

(a) DNA-Molekülen, die mindestens eine antisense-RNA codieren, welche eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die Asparagin-Synthetase-Proteine codieren;

(b) DNA-Molekülen, die über einen Cosuppressionseffekt zu Verringerung der Expression von endogenen Genen führen, die Asparagin-Synthetase-Proteine codieren;

(c) DNA-Molekülen, die mindestens ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte von endogenen Genen spaltet, die Asparagin-Synthetase-Proteine codieren;

(d) mittels in vivo-Mutagenese eingeführter Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in endogenen Asparagin-Synthetase-Protein codierenden Genen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven Asparagin-Synthetase-Protein bewirkt;

(e) DNA-Molekülen, die simultan mindestens eine antisense-RNA und mindestens eine sense-RNA codieren, wobei besagte antisense-RNA und

besagte sense-RNA ein doppelsträngiges RNA-Molekül ausbilden, das eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die Asparagin-Synthetase-Proteine codieren;

(f) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, wobei die Integration der Transposonsequenzen zu einer Mutation oder einer Insertion in endogenen Asparagin-Synthetase-Proteinen codierenden Genen führt, welche zu einer Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven Asparagin-Synthetase-Proteinen bewirkt; und

(g) T-DNA Moleküle, die durch Insertion in endogenen Asparagin-Synthetase-Protein codierenden Genen eine Verringerung der Expression von Asparagin-Synthetase-Protein codierenden Genen oder die Synthese von inaktiven Asparagin-Synthetase-Proteinen bewirkt.

31. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, worin besagte genetische Modifikation zu einer Erhöhung der Aktivität eines ADP-Glukose Pyrophosphorylase-Proteins führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

32. Verfahren nach Anspruch 31, worin besagte genetische Modifikation in der Einführung eines oder mehrerer fremder Nucleinsäuremoleküle besteht, deren Vorhandensein und/oder Expression zur Erhöhung der Aktivität eines oder mehrerer in der Pflanzenzelle vorkommenden ADP-Glukose Pyrophosphorylase-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

33. Verwendung von pflanzlichem Material gemäß einem der Ansprüche 1, 3, 4, 5, 6, 11-23 oder 25-32 zur Herstellung von wärmebehandelten Lebensmitteln, welche im Vergleich zu entsprechenden herkömmlichen wärmebehandelten Lebensmitteln einen verringerten Acrylamidgehalt aufweisen.

34. Verwendung von pflanzlichem Material, das im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichen pflanzlichen Material einen verringerten Gehalt an löslichen Zuckern und/oder Aminosäuren aufweist, zur Herstellung von wärmebehandelten Lebensmitteln mit verringertem Acrylamidgehalt.

35. Verwendung nach Anspruch 34, worin besagter Acrylamidgehalt um mindestens 15% verringert ist im Vergleich zum Acrylamidgehalt von entsprechenden herkömmlichen wärmebehandelten Lebensmitteln.

36. Verwendung nach Anspruch 34 oder 35, worin besagter Gehalt an löslichen Zuckern um mindestens 10% verringert ist im Vergleich zum Gehalt an löslichen Zuckern von entsprechendem herkömmlichen pflanzlichen Material.

37. Verwendung nach Anspruch 36, worin der lösliche Zucker Glukose und/oder Fruktose ist.

38. Verwendung nach einem der Ansprüche 33 bis 37, worin die Wärmebehandlung besagter wärmebehandelter Lebensmittel bei Temperaturen von mindestens 100°C erfolgt.

39. Verwendung nach einem der Ansprüche 33 bis 38, worin besagte Lebensmittel ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Kartoffelchips, Pommes Frites, Kartoffelpuffer, Keksen, Krackern, Knäckebrot, Frühstückscerealien, Maischips (Tacos), Pop Corn, Brotchips, Waffeln, Salzstangen, Kaffee, Brot, Brötchen, Kuchen, Reischips und Toastbrot.

40. Verwendung nach einem der Ansprüche 33 bis 39, worin das verwendete pflanzliche Material dadurch gekennzeichnet ist, dass es genetisch modifiziert ist, wobei die genetische Modifikation zu einer Verringerung des Gehaltes an löslichen Zuckern führt im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichen pflanzlichen Material von Wildtyp-Pflanzen.

41. Verwendung nach Anspruch 40, worin besagte genetische Modifikation zu einer Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden R1-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

42. Verwendung nach Anspruch 41, worin besagte genetische Modifikation in der Einführung eines oder mehrerer fremder Nucleinsäuremoleküle besteht, deren Vorhandensein und/oder Expression zur Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden R1-Proteine führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

43. Verwendung nach Anspruch 42, worin besagte fremde Nucleinsäuremoleküle ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

(a) DNA-Molekülen, die mindestens eine antisense-RNA codieren, welche eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die R1-Proteine codieren;

(b) DNA-Molekülen, die über einen Cosuppressionseffekt zu Verringerung der Expression von endogenen Genen führen, die R1-Proteine codieren;

- (c) DNA-Molekülen, die mindestens ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte von endogenen Genen spaltet, die R1-Proteine codieren;
- (d) mittels in vivo-Mutagenese eingeführter Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in endogenen R1-Proteinen codierenden Genen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven R1-Proteinen bewirkt;
- (e) DNA-Molekülen, die simultan mindestens eine antisense-RNA und mindestens eine sense-RNA codieren, wobei besagte antisense-RNA und besagte sense-RNA ein doppelsträngiges RNA-Molekül ausbilden, das eine Verringerung der Expression von endogenen Genen bewirkt, die R1-Proteine codieren;
- (f) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, wobei die Integration der Transposonsequenzen zu einer Mutation oder einer Insertion in endogenen R1-Proteinen codierenden Genen führt, welche zu einer Verringerung der Expression besagter Gene oder die Synthese von inaktiven R1-Proteinen bewirkt; und
- (g) T-DNA Moleküle, die durch Insertion in endogenen R1-Protein codierenden Genen eine Verringerung der Expression von R1-Protein codierenden Genen oder die Synthese von inaktiven R1-Proteinen bewirkt.

44. Verwendung von pflanzlichem Material gemäß einem der Ansprüche 1, 3, 4, 5, 6, 11-23 oder 25-32 zur Verringerung des Acrylamidgehaltes von wärmebehandelten Lebensmitteln.

45. Verfahren zur Identifizierung von pflanzlichem Material, das für die Herstellung von wärmebehandelten Lebensmitteln mit einem verringerten Acrylamidgehalt geeignet ist, umfassend:

- a) die Bestimmung des Gehaltes an löslichen Zuckern und/oder Aminosäuren von pflanzlichem Material, das zur Herstellung von wärmebehandelten Lebensmitteln geeignet ist; und
- b) die Auswahl solchen pflanzlichen Materials gemäß Verfahrensschritt a), das im Vergleich zu entsprechendem herkömmlichen pflanzlichen Material einen verringerten Gehalt an löslichen Zuckern und/oder Aminosäuren aufweist.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verringerung des Acrylamidgehaltes von wärmebehandelten Lebensmitteln im Vergleich zu entsprechenden herkömmlichen wärmebehandelten Lebensmitteln.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.